Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH
H. v. GUTTENBERG-ROSTOCK, **R. HARDER**-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN
W. RUHLAND-UNTERDEUFSTETTEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

53. BAND, 1. HEFT
MIT 50 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 9. APRIL 1959)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1959

Planta (Berl.)

Preis DM 21.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland, L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 83 03 01

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

53. Band **Inhaltsverzeichnis** 1. Heft

Seite

Mohr, H., und G. Schoser, Eine Interferenzfilter-Monochromatoranlage für photobiologische Zwecke. Mit 9 Textabbildungen 1

Reinert, J., und H. Schraudolf, Über die physiologischen Eigenschaften von Gewebekulturen aus Tumor- und normalem Gewebe von *Picea glauca*. Mit 4 Textabbildungen 18

Busse, M., Über die Wirkungen von Kobalt auf Streckung, Atmung und Substanzeinbau in die Zellwand bei Avenakoleoptilen. Mit 4 Textabbildungen 25

Nanda, K. K., and K. C. Hamner, Photoperiodic cycles of different lengths in relation to flowering in Biloxi soybean (Glycine max L.; Merr.). With 1 Figure in the Text 45

Nanda, K. K. and K. C. Hamner, The effect of temperature, auxins, antiauxins and some other chemicals on the endogenous rhythm affecting photoperiodic response of Biloxi soybean (Glycine max L.; Merr.). With 2 Figures in the Text 53

Bohling, H., Papierchromatographische Untersuchungen über die Wuchs- und Hemmstoffe des Haferkeimlings und des Maisscutellums. Mit 30 Textabbildungen 69

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta, 53, 1—17 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

EINE INTERFERENZFILTER-MONOCHROMATORANLAGE FÜR PHOTOBIOLOGISCHE ZWECKE

Von

H. Mohr und G. Schoser

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. Dezember 1958)

1. Einleitung

Die gegenwärtigen Fortschritte im Bereich der Photobiologie hängen mit physikalisch-technischen Verbesserungen hinsichtlich der Strahlungserzeugung und Strahlungsmessung sowie mit wichtigen Verbesserungen der Versuchsanstellung selber zusammen. In dieser Arbeit interessiert uns die physikalisch-technische Seite. Diese Veröffentlichung stellt zugleich die Arbeitsweise spezieller Untersuchungen dar, über die schon kurz berichtet worden ist oder über die später unter kurzem Hinweis auf diesen „methodischen Teil" berichtet werden soll.

Es hat sich in den vergangenen Jahren gezeigt, daß schon für halbquantitative Arbeiten genau definierte und konstante Strahlungsquellen verwendet werden müssen und daß für korrekte, quantitative photobiologische Untersuchungen, z. B. im Zusammenhang mit der Aufstellung von Wirkungsspektren, weitgehend monochromatische Strahlung (definiert nach Wellenlänge und Intensität) erforderlich ist. Es werden oft gleichzeitig relativ hohe Intensität und hohe spektrale Reinheit der Strahlung benötigt. Ferner ist es meist notwendig, daß eine relativ große Fläche homogen bestrahlt wird.

Praktisch werden heute nur zwei Wege beschritten, um monochromatische Strahlung für biologische Zwecke herzustellen: Prismen- bzw. Gitterspektrographen und Interferenzfiltermonochromatorsysteme. Hochleistungsspektrographen (mit Kohlebogen als Strahlungsquelle) sind während des vergangenen Jahrzehnts in die Photobiologie eingeführt worden (Parker u. Mitarb. 1946, Monk und Ehret 1956). Die Eigenschaften der Spektrographen und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Photobiologie werden auch bei Withrow und Withrow (1956) diskutiert. Die großen Erfolge, die durch die Beltsville-Gruppe mit Hilfe ihres Spektrographen erzielt wurden, sind weithin bekanntgeworden (vgl. z. B. die Zusammenfassungen bei Borthwick und Hendricks 1959 oder Mohr 1959). Ein in jeder Hinsicht ideales Instrument ist der Spektrograph jedoch auch nicht, obwohl Monk und Ehret eine hervorragende Anlage geschaffen haben.

Besonders für den Biologen zuweilen recht unangenehme Eigenschaften des Spektrographen sind z. B.: Inhomogene Dispersion (Prismenspektrograph), „Streulicht" der nicht erwünschten Ordnungen (Gitterspektrograph), das mit zusätzlichen Filtersystemen eliminiert werden muß, inhomogene Intensitätsverteilung entlang des Spektrums, Inkonstanz der Emission des Kohlebogens, häufiger Kohlenwechsel. Man kann die Emission des Kohlebogens nicht erheblich variieren. Verändert man die Intensität der Strahlung — bevor sie in das dispergierende System eintritt — durch Neutralfilter, so variiert man stets die Intensität an allen Stellen des Spektrums. Will man die Intensität an einer bestimmten Stelle des Spektrums ändern, so kann man dies nur durch Neutralfilter tun. Es fehlt also die Möglichkeit, die Intensität gleitend zu variieren. Als einen Nachteil des Spektrographen beim Gebrauch durch den Biologen kann man auch die Tatsache ansehen, daß das optische System nicht einfach zu justieren und zu eichen ist. Außerdem sind gute und ausreichend große Gitter und Prismen sehr teuer. Ein großer Vorteil ist, daß man gleichzeitig bei hoher Auflösungskraft mit dem gesamten Spektrum, das das Instrument liefert, arbeiten kann. Die adäquate Eliminierung des Streulichts ist dabei allerdings ein großes Problem.

Die Entwicklung der Interferenzfilter gab dem Biologen die Möglichkeit, einen relativ einfachen Monochromatortyp zu bauen, der für biologische Zwecke besonders geeignet ist. Eine einfache Anlage dieser Art, die nur zur Erzeugung geringer Strahlungsintensitäten bestimmt war, hat z. B. Mohr (1956a, b) verwendet. Withrow (1957) hat ein sehr viel leistungsfähigeres System konstruiert und mit Erfolg für photobiologische Experimente eingesetzt (Withrow u. Mitarb. 1957). Wir haben eine ähnlich leistungsfähige Anlage fertiggestellt und seit einiger Zeit in Betrieb (Mohr 1958, Mohr und Lünenschloss 1958).

Das Interferenzfilter-Monochromatorsystem hat gewichtige Vorteile. So werden z. B. die einzelnen Wellenlängen gänzlich unabhängig voneinander erzeugt, und die Intensität jeder Wellenlänge kann für sich kontinuierlich variiert werden. Bei Verwendung adäquater Strahlungsquellen kommt, bezogen auf die gleiche Intensität (z. B. bei $\lambda = 500\ \mathrm{m}\mu$), das Interferenzfiltersystem an Auflösungskraft dem Spektrographen nahe. Man muß ja auch beachten, daß für biologische Experimente meist eine *größere* Fläche mit *demselben* Wellenlängenbereich bestrahlt sein soll. Auch dies kann (neben dem Bedarf an Intensität) dazu führen, daß die Spaltbreite am Spektrographen ziemlich groß gehalten werden muß. Gewichtige Nachteile des Interferenzfiltersystems sind z. B., daß man zur selben Zeit nur mit wenigen Wellenlängen arbeiten kann und daß die Eliminierung der „Hintergrund-Strahlung", besonders bei Verwendung von einfachen Interferenzfiltern, große Schwierigkeiten macht.

2. Interferenzfilter

Wir verwenden im allgemeinen Interferenz-Linienfilter, die uns vom Glaswerk Schott und Gen., Mainz, geliefert werden. Diese Interferenzfilter haben einen Durchmesser von 50 mm und sind vom Fabry-Pérot-Typ (Transmissions-Interferenzfilter, hergestellt in 2. Interferenz-Ordnung).

Interferenzfilter sind von Geffcken (1948) erstmals beschrieben worden. Seitdem haben sie eine weite Verbreitung gefunden und große Bedeutung erlangt. Es liegen verschiedene ausführliche Besprechungen (Turner 1950, Greenland 1952, Withrow und Withrow 1956) und einschlägige Broschüren der Hersteller vor

(z. B. Schott und Gen. 1957, dort weitere Literatur). Es sollen deshalb über die Interferenzfilter als solche nur einige knappe Angaben gemacht werden, zumal wir auf die Qualität der Filter keinen Einfluß haben. Wir sind hinsichtlich der Filter, auch hinsichtlich ihrer optischen Charakteristik, ganz auf die Hersteller angewiesen. Zur Zeit arbeiten wir mit einer größeren Anzahl von Linienfiltern zwischen 400 und 800 mμ (Tabelle).

Tabelle. *Die charakteristischen Daten der von uns zur Zeit verwendeten einfachen Interferenz-Linienfilter für senkrechten Lichteinfall*

λ_{Max} (mμ)	T_{Max} (%)	HW (mμ)	λ_{Max} (mμ)	T_{Max} (%)	HW (mμ)
402	35	12	589	46	10
412	45	9	613	50	13
420	30	8	629	46	13
427	40	14	640	43	13
440	37	11	649	37	10
447	40	9	659	49	16
454	49	13	660	40	10
458	45	15	670	44	11
469	36	9	679	42	13
478	33	11	689	39	14
485	45	12	706	30	12
488	39	10	714	59	16
498	45	13	719	38	16
509	38	10	728	31	12
528	44	14	745	43	13
554	42	10	749	45	14
568	48	13	800	40	10

(Nach den Angaben von Schott und Gen., Mainz). Es bedeuten: λ_{Max} Wellenlänge der maximalen Durchlässigkeit. T_{Max} prozentuale Durchlässigkeit im Maximum (also bei λ_{Max}). HW Halbwertsbreite = Breite der Filterkurve bei $T_{Max}/_2$. ZW Zehntelwertsbreite = Breite der Filterkurve bei $T_{Max}/_{10}$. ($HW = ZW/3$).

Die Interferenz-Linienfilter vom Fabry-Pérot-Typ bestehen aus zwei teilweise durchlässigen Silberschichten (auf Glas), zwischen denen sich eine äußerst dünne Lage eines durchsichtigen Nichtmetalls (Dielektrikum) befindet. Die Lage der Durchlaßstellen der Filter hängt von der optischen Dicke dieser Schicht ab. Es gilt für senkrechten Lichteinfall:

$$n \cdot \lambda_{n.Ord.} = 2\,(d + K),$$

wobei n Ordnung der betreffenden Interferenz, $\lambda_{n.Ord.}$ Wellenlänge des Maximums n. Ordnung, d optische Dicke des Nichtmetalls, K additiver, praktisch für einen großen Wellenlängenbereich konstanter Term, der sich aus der Theorie der Metallreflexion berechnen läßt und sich formal wie eine scheinbare Schichtdickenvergrößerung auswirkt. Da die 2. Interferenzordnung benützt wird, so muß die Strahlung der anderen Ordnungen („Nebenmaxima") durch zusätzliche Farbgläser eliminiert werden. Entsprechende Farbgläser werden von den Herstellern bereits angebracht (auf Wunsch auch für den Bereich der 1. Interferenzordnung). Nach den brieflichen Mitteilungen von Schott und Gen. wird dadurch bei den einfachen Interferenz-Linienfiltern erreicht, daß nach den kürzeren Wellenlängen hin die Durchlässigkeit im Abstand von etwa 50 mμ von λ_{Max} nur noch $^1/_{1000}$ von T_{Max} beträgt. An den Stellen der kurzwelligen Nebenmaxima beträgt die Durchlässigkeit nicht mehr als $^1/_{1000}$%. Im Wellenlängenbereich oberhalb T_{Max} beträgt die Durchlässigkeit

im Abstand von 100 mμ von λ_{Max} etwa $^1/_{100}$ von T_{Max}. An der Stelle des langwelligen „Nebenmaximums" beträgt die Durchlässigkeit auf keinen Fall mehr als $^1/_{20}$ von T_{Max}. Zusätzlich dazu ist unser optisches System so gebaut (vgl. unten), daß auf die Interferenzfilter nur Strahlung von $\lambda < 900$ mμ trifft. Die 1. Interferenzordnung spielt deshalb als „Hintergrund-Erzeuger" bei den von uns zur Zeit verwendeten Filtern praktisch keine Rolle. Die typische Durchlaßkurve eines einfachen Interferenz-Linienfilters zeigt Abb. 1.

Ein schwieriges Problem ist die „filterfremde" Reststrahlung („Hintergrund"). Die Interferenzfilter lassen eben nicht nur Strahlung an den Stellen der Interferenzmaxima durch, sondern — in geringen Quantitäten allerdings — über den gesamten Spektralbereich hinweg („Hintergrund"). Die Durchlässigkeit für den „Hintergrund" wird durch die Dicke der Silberschicht bestimmt. Je dünner die Filme, um so höher sind die Gipfel-Transmission (T_{Max}) und der „Hintergrund". Die spektrale Reinheit kann, allerdings auf Kosten der durchgelassenen Intensität, durch die Verwendung von Doppel-Linienfiltern (anstelle der einfachen!) sehr stark erhöht werden (vgl. z. B. Schott und Gen. 1957 oder Withrow 1957). Bisher haben wir nur einfache Linienfilter verwendet, da uns an möglichst hohen Intensitäten gelegen war. Entsprechend geringere Ansprüche konnten wir an die Monochromasie stellen. Allgemein haben wir bei der spektroskopischen Prüfung der uns gelieferten Filter festgestellt, daß der Hintergrund auf der kurzwelligen Seite von λ_{Max} durch Farbgläser praktisch total abgeschirmt ist, nicht aber auf der langwelligen Seite der benutzten Durchlaßstelle. Dies entspricht auch den Angaben der Hersteller (vgl. Abb. 1). Unsere Messungen über die Quantität des „Hintergrunds" stehen ebenfalls meist im Einklang mit den Angaben der Hersteller. Man kann versuchen, den längerwelligen „Hintergrund" der Blaufilter durch blaue Farbgläser weiter zu reduzieren. Dies bleibt jedoch unbefriedigend und läßt sich nicht ohne beträchtliche Intensitätsverluste für das Blaulicht selber durchführen. Ist man bei bestimmten Arbeiten auf sehr hohe spektrale Reinheit angewiesen, so wendet man wohl am besten Doppellinienfilter an. Ein Nachteil der zur Zeit zur Verfügung stehenden Interferenzfilter

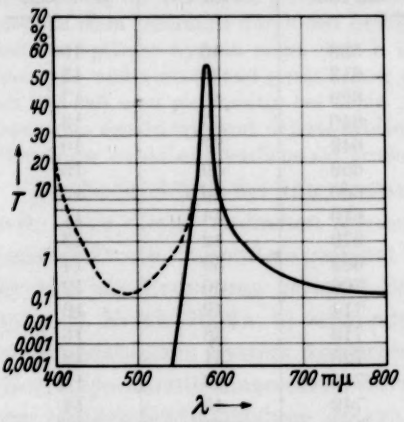


Abb. 1. Typische Durchlaßkurve eines einfachen Interferenz-Linienfilters für senkrechten Lichteinfall. Durch Kombination mit einem geeigneten Farbglas wird der unerwünschte kurzwellige Durchlaßbereich (gestrichelte Kurve) praktisch abgeschnitten (ausgezogene Kurve). Abszisse: Wellenlänge λ im linearen Maßstab; Ordinate: Durchlässigkeit T (in %). Der Ordinatenmaßstab ist doppellogarithmisch gedehnt. (Nach Schott und Gen., Mainz 1957)

ist, daß sie noch uneinheitlich in ihren Eigenschaften sind. So sind die Gipfel-Durchlässigkeit (T_{Max}) und damit der „Hintergrund" von Filter zu Filter verschieden (vgl. Tabelle), ebenso die Halbwertsbreite (HW). Wir haben mit Spektroskop und Spektrograph festgestellt, daß z. B. die Filter des Blaubereiches hinsichtlich der Intensität ihres längerwelligen „Hintergrunds" beträchtliche Schwankungen zeigen. Man muß sich also stets fragen, wenn man die mit verschiedenen Filtern gewonnenen physiologischen Resultate miteinander vergleicht (z. B. bei der Aufstellung eines Wirkungsspektrums), ob kleine Differenzen real sind oder ob sie auf der ungleichen Qualität der Filter beruhen.

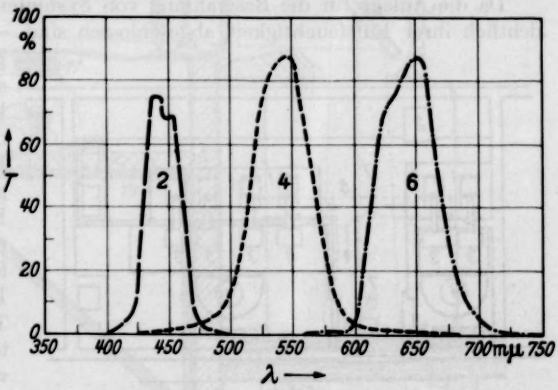


Abb. 2. Die Durchlaßkurven der zur Zeit von uns verwendeten Interferenz-Breitbandfilter (Vielschichtfilter) für senkrechten Lichteinfall. Type Filtraflex —K_2, —K_4, —K_6. (Nach den Angaben der Gerätebau-Anstalt Balzers, Liechtenstein)

Interferenzfilter zeigen eine sog. „Winkelabhängigkeit". Ihre vom Hersteller angegebenen charakteristischen Daten gelten nur für senkrechten Einfall paralleler Strahlen. Wird die Filternormale gegen die optische Achse des telezentrischen Strahlengangs geneigt, so verschiebt sich λ_{Max} nach kürzeren Wellenlängen. Außerdem ergibt sich eine Verbreiterung und Erniedrigung der Durchlässigkeitskurve. Gleichzeitig tritt eine Aufspaltung in zwei senkrecht zueinander polarisierte Durchlaßbanden ein. Obgleich bei den neuen, von uns ausschließlich verwendeten Schottschen Filtern die charakteristische Filterkurve erst bei stärkerer Neigung eine erhebliche Veränderung erfahren soll (vgl. Schott und Gen. 1957), so achten wir doch genauestens darauf, daß die Filter senkrecht auf der optischen Achse stehen und daß die auf die Filter fallende Strahlung weitgehend parallel ist.

Wollen wir breite Spektralbereiche mit hoher Intensität isolieren, so verwenden wir Interferenz-Breitbandfilter (von Gerätebau Balzers, Abb. 2). Es handelt sich um Vielschichtfilter (Multilayer interference filter), die mit Farbgläsern kombiniert sind (vgl. z. B. einschlägige Broschüren von Gerätebau-Anstalt, Balzers, Liechtenstein).

3. Übersicht über die Anlage

Es bestand die Notwendigkeit, mit monochromatischer Strahlung relativ hoher Intensität in Kammern mit konstanter Temperatur zu

arbeiten. Unsere Absicht war, die monochromatische Strahlung außerhalb der Kammern zu erzeugen, so daß die mit der Herstellung monochromatischer Strahlung verbundene Wärmeentwicklung nicht in den Kammern stattfinden würde (Vermeidung von Wärmeherden). Wie das Problem gelöst wurde, zeigt Abb. 3. Wir benützen 2 Kammern mit regulierbarer Temperatur. Die kleine Kammer 2 ist zwischen 0 und 40° C, die größere Kammer 1 ist zwischen 10 und 35° C zu gebrauchen. Jede Kammer besitzt eine eigene Heiz- und Kühleinrichtung (Kontaktthermometer).

Da die Anlage für die Bestrahlung von Systemen konstruiert wurde, die hinsichtlich ihrer Luftfeuchtigkeit abgeschlossen sind — z. B. mit Glasdeckeln abgedeckte Petrischalen konstanter innerer Luftfeuchtigkeit —, so ist eine Regulierung der Luftfeuchtigkeit in den Kammern bisher nicht eingebaut. Für die Geräte in den Kammern ist eine relativ niedrige und konstante Luftfeuchtigkeit günstig. Diese Bedingung ist meist gegeben. Temperatur und Luftfeuchtigkeit in beiden Kammern werden laufend registriert (Thermo-Hygrograph).

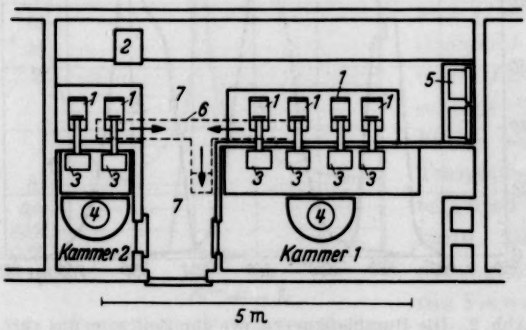


Abb. 3. Schematische Anordnung der wichtigsten Teile der Anlage in Aufsicht (vgl. Text). Die Innenwände der Kammern (Dunkelkammern) sind matt schwarz (Streulichtabsorption). Auch in den Vorraum gelangt kein Tageslicht. *1* Projektoren; *2* Netzregler; *3* Bestrahlungskästen; *4* Temperaturregulation; *5* Maschinen und Steuersystem für die Temperaturregulation; *6* Abzugsystem zur Entfernung der Warmluft aus dem Bereich der Projektoren; *7* Vorraum

Die monochromatische Strahlung wird von Apparaten geliefert, die im Prinzip mit Spezialobjektiven langer Brennweite ausgestattete Projektoren vom Typ Prado 500 (Leitz, Wetzlar) sind. Die Projektoren sind in dem lichtdichten Vorraum außerhalb der Kammern montiert. Ihre Objektive ragen durch die durchbohrte Wand in die Kammern hinein (Abdichtung mit Glaswolle). Die Temperaturkonstanz der Kammern wird durch diese Anordnung nicht beeinflußt. Die große Kammer ist mit 4, die kleine mit 2 Projektoren ausgestattet. Ihre Anordnung und Justierung ist stets dieselbe. Die folgende Besprechung einer Projektoreinheit gilt deshalb für alle.

Als unmittelbare Stromquelle für die ganze Anlage dient ein weitgehend last- und frequenzunabhängiger Netzregler (Ruhstrat, Göttingen; Einphasen-Netzregler Voltastat H mit elektrohydraulischem Relais, Type NS, 6000 W, zulässige Netzspannungsschwankungen: +15%, −20%, Regelzeit von maximaler Spannungsabweichung bis zum Sollwert etwa 1,5 sec, automatische Rückstellvorrichtung).

4. Übersicht über Optik und Strahlengang

Abb. 4 zeigt einen Längsschnitt durch unser optisches System, dessen Einzelteile leicht auswechselbar sind. Die optischen Verhältnisse sind weitgehend durch die von uns aufgrund unserer Ansprüche ausgesuchte Konstruktion des Prado 500 gegeben. Da wir an der prinzipiellen Kon-

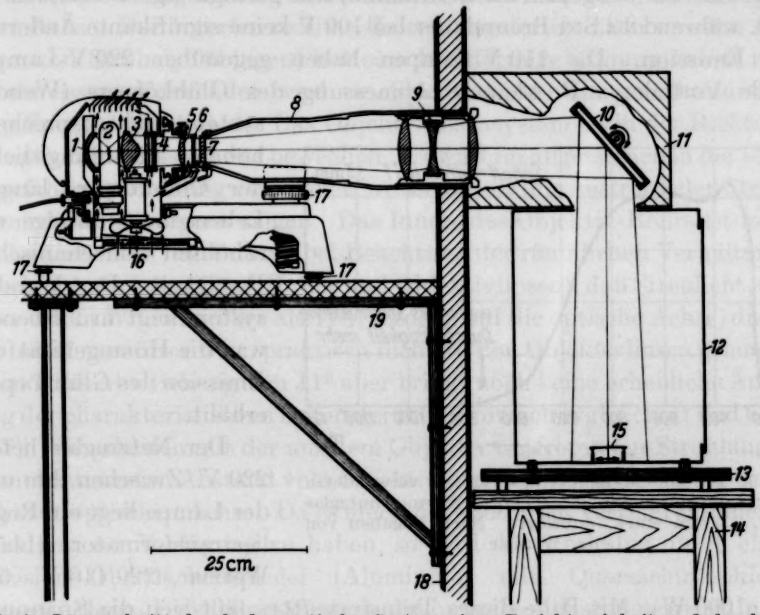


Abb. 4. Längsschnitt durch das optische System einer Projektoreinheit und durch den dazugehörigen Bestrahlungskasten. (Unter Verwendung einer maßstäblichen Zeichnung von Leitz, Wetzlar). Es bedeuten: *1* Hohlspiegelreflektor; *2* Projektionslampe (500 bzw. 750 W, 110 V); *3* Asphärische Kondensorlinse; *4* Infrarotabsorptionsfilter (5,5 mm KG 1); *5* Sphärische Kondensorlinse; *6* Diahalter (für Blende und Neutralgläser); *7* Interferenzfilter-Halter mit Interferenzfilter; *8* Objektiv; *9* Objektivlinsensystem (entlang der optischen Achse verschiebbar, im eingefahrenen Zustand gezeichnet); *10* Spiegelhalter mit Oberflächenspiegel; *11* Schutzhülle (schwarzes Blech); *12* Bestrahlungskasten (aus Stahlblech, mit Tür); *13* Marmorplatte; *14* Tisch; *15* Benützter Anteil der ausgeleuchteten Fläche; *16* Kühlgebläse (die kleinen Pfeile geben die Strömungsrichtung der Luft an); *17* Justierschrauben; *18* Wand der Klimakammer (mit Isolierschicht); *19* Trägertisch für Projektor

struktion des Projektorsystems nichts geändert haben, so brauchen optische Details nicht näher besprochen zu werden (vgl. z. B. die einschlägigen Broschüren von Leitz, Wetzlar). Das wesentliche Problem für uns war, die für die Erzeugung der monochromatischen Strahlung notwendigen Zutaten möglichst sinnvoll in dem gegebenen optischen System unterzubringen. Dabei waren Kompromisse nicht zu umgehen.

Als Strahlungsquellen haben wir bisher nur Schmalfilmlampen verwendet (Typ Osram 588 880 E, 110 V, 500 W bzw. 588 980 E, 110 V, 750 W). Die Lampen laufen bei Vollast bei der höchsten für den Wolfram-Glühfaden zulässigen Temperatur (etwa 3000° C). Die mittlere Lebens-

dauer ist entsprechend kurz (25 Std bei 110 V). Werden die Lampen mit Unterspannung betrieben — was bei uns meist geschieht —, so wird die mittlere Lebensdauer stark erhöht. Die Gesamtemission der Lampen nimmt mit der Brennzeit ab („Alterung"). Bei den Lampen jedoch, die wir daraufhin gemessen haben, war diese Abnahme (innerhalb des von uns geprüften Zeitraums!) nur geringfügig. So fanden wir z. B. während 12 Std Brenndauer bei 109 V keine signifikante Änderung der Emission. Die 110 V-Lampen haben gegenüber 220 V-Lampen große Vorteile, z. B. kleinere Abmessung des Glühkörpers (Wendelsystem) und entsprechend höhere Strahlungsdichte der Glühkörper, längere Lebensdauer infolge der erhöhten mechanischen Festigkeit. Das Wendelsystem liegt in 2 Ebenen, was die Homogenität der Emission des Glühkörpers erhöht.

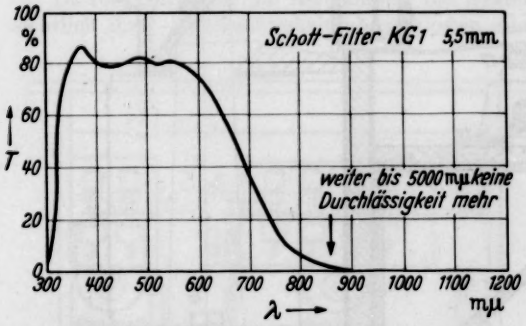


Abb. 5. Die Durchlaßkurve des von uns verwendeten Infrarotabsorptionsfilters (Schott Wärmeschutzglas KG 1, 5,5 mm stark, unbelegt). Nach Angaben von Leitz, Wetzlar

Der Netzregler liefert 220 V. Zwischen ihm und der Lampe liegt ein Reguliertransformator (Leitz, Wetzlar, 220/110 V, 500 bzw. 1000 W). Mit Hilfe dieses Transformators läßt sich die Spannung an der Lampe leicht und genau zwischen etwa 90 und 110 V variieren, was für die Feineinstellung der Intensität wichtig ist.

Wir besprechen nun kurz die einzelnen Teile der optischen Einrichtung. Das asphärische zweilinsige Kondensorsystem (Glaslinsen) mit Reflektor (Hohlspiegel) gestattet bei adäquater Justierung eine sehr gute Ausnutzung der Strahlungsemission des Glühkörpers. Der Reflektor bildet das Lampenwendelsystem in der Wendelebene ab und ermöglicht dadurch die Verwendung eines beträchtlichen Teils der nach hinten abgestrahlten Energie. Das Kondensorsystem ist auf das Objektiv abgestimmt. Alle Kondensor- und Objektivlinsen sind oberflächenvergütet (Antireflexbelag). Das Infrarotabsorptionsfilter (5,5 mm KG 1 von Schott und Gen.), das zwischen den beiden Linsen des Kondensorsystems angebracht ist, absorbiert praktisch alle Strahlung oberhalb 900 mμ (Abb. 5), so daß auf die Interferenzfilter nur Strahlung der Wellenlängen <900 mμ trifft. In der Konstruktion sind 2 Infrarotabsorptionsfilter ($2\times5{,}5$ mm KG 1) vorgesehen. Im allgemeinen verwenden wir jedoch nur 1 Filter. Die Lochblenden sind auswechselbar und haben 14, 28 oder 42 mm Durchmesser. Sie stehen an der Stelle,

die im normalen Projektor das Dia einnimmt. Welche Blende verwendet wird, hängt von den Anforderungen hinsichtlich der Intensität und der homogenen Ausleuchtung ab. Die auf das Interferenzfilter fallende Strahlung ist befriedigend parallel. (Wegen der maximal möglichen Abweichung von der optischen Achse vgl. unten). Der Interferenzfilter-Halter (und damit das Interferenzfilter!) steht senkrecht auf der optischen Achse. Der Interferenzfilter-Halter (angefertigt nach unseren Angaben von Strebel, Tübingen) hat eine kreisförmige Öffnung von 45 mm Durchmesser. Verwendet wird ein Spezialobjektiv langer Brennweite (Typ Epis, $f = 40$ cm, 1:4). Das Objektivlinsensystem ist in der Richtung der optischen Achse etwas beweglich. Es wird im allgemeinen in der total ausgefahrenen Stellung verwendet, wobei die aus ihm austretenden Strahlen minimale Divergenz zeigen. Das Innere des Objektiv-Rohrs ist matt geschwärzt. Dies führt dazu (bei Beachtung der räumlichen Verhältnisse zwischen Interferenzfilter-Halter und Objektivlinsen), daß Streulicht, das unter einem Winkel größer als 11° (bezogen auf die optische Achse) durch das Interferenzfilter tritt, praktisch nicht zu den Objektivlinsen gelangen kann. Eine Abweichung von 11° aber bringt noch keine erhebliche Änderung der charakteristischen Daten der Filter mit sich (vgl. Schott und Gen. 1957). Wir arbeiten mit der aus dem Objektiv austretenden Strahlung in einem bestimmten Abstand vom Objektiv (vgl. Abb. 4) in der Ebene senkrecht zur optischen Achse. Da es meist notwendig ist, vertikal einfallende Strahlung zur Verfügung zu haben, so wird die Strahlung durch einen Präzisions-Oberflächenspiegel (Aluminium mit Quarzschutzschicht, Heraeus, Hanau), der um 45° gegen die optische Achse geneigt ist, nach unten in einen Kasten aus schwarzem Stahlblech reflektiert (durch eine Öffnung von 10 cm Durchmesser). In diesem Kasten ist ein Kreis ausgeleuchtet, dessen Größe etwas von der verwendeten Blende abhängt. Im allgemeinen benutzen wir für unsere Experimente nur einen kleinen Kreis vom Durchmesser 50 mm im Zentrum des ausgeleuchteten Kreises. Wir arbeiten gezwungenermaßen außerhalb der Bildebene (Abbildung der Lochblende). Für uns ist zur Zeit eine möglichst große Konzentrierung der Strahlung vordringlich, die wir, falls wir überhaupt das Prado-Prinzip mit Epis 40 verwenden wollen, am ehesten durch die angegebene Anordnung erreichen. Der von uns benützte Kreis (Durchmesser 50 mm) ist befriedigend homogen ausgeleuchtet. Bei richtiger Justierung und großer Lochblende sind innerhalb dieses Kreises die von uns festgestellten Abweichungen der Intensität vom Mittelwert nicht größer als 7% (Ausmessung mit einer fensterlosen Kleinflächen-Thermosäule von Lange, Berlin, deren Empfängerfläche so hoch liegt, daß bei den auftretenden Winkeln kein starker „Cosinus-Fehler" vorhanden sein kann). Die Ausleuchtung der ganzen beleuchteten Fläche ist freilich nicht so homogen wie etwa in der Bildebene, sondern zwischen Zentrum

und Rand der beleuchteten Fläche beobachtet man einen beträchtlichen Intensitätsabfall. Dies hat aber gerade den von uns gewünschten Effekt, daß nämlich die Intensität innerhalb des von uns verwendeten, nahezu homogen ausgeleuchteten inneren Kreises von 50 mm Durchmesser besonders hoch ist.

Mit einer 750 W-Lampe, die bei 110 V brennt, messen wir in diesem inneren Kreis 85000 Lux („Luxmeter" von Lange, Berlin). Befindet sich das Interferenz-Linienfilter $\lambda_{Max} = 412$ mμ (z. Z. die kürzeste von uns benützte Linie) im Strahlengang, so messen wir eine Intensität von 1500 erg/cm^2 · sec (vgl. Abschnitt 6). Bei den längeren Wellenlängen ($\lambda_{Max} > 412$ mμ) erzielen wir erheblich bzw. sehr viel höhere Intensitäten (z. B. mit dem Filter $\lambda_{Max} = 613$ mμ: 14000 erg/cm^2 · sec).

5. Einige Details (vgl. Abb. 4)

a) Der Oberflächenspiegel, der die horizontal einfallende Strahlung vertikal nach unten reflektiert, wird von einem Spiegelhalter getragen, der um eine horizontale Achse senkrecht zum Strahlengang beweglich ist. Dies ist für die Feinjustierung von Bedeutung. Die Stahlkästen, in die hinein die Strahlung reflektiert wird, sind auf Marmorplatten befestigt. Diese wirken infolge ihres geringen Ausdehnungskoeffizienten Verbiegungen des Metalls bei raschem Temperaturwechsel entgegen. Andererseits stabilisieren sie infolge ihrer Schwere die Position der Kästen. Die Marmorplatten sitzen auf kleinen Metallfüßen und sind auf dem Tisch frei beweglich. Die Oberfläche der Marmorplatten ist horizontal. Auch der Spiegelhalter ist in der Marmorplatte verankert.

b) Der Interferenzfilterhalter ist gegen das Objektiv im Objektivhalter verschraubt. Seine kreisförmige Öffnung hat 45 mm Durchmesser. Gegen diese Öffnung werden die Interferenzfilter (50 mm Durchmesser) durch zwei mit schwachen Zugfedern versehene Halter gedrückt.

c) In dem geschwärzten Diahalter befindet sich anstelle des Diapositivs die jeweils gewünschte Blende. Neben der Blende können in den Diahalter ein oder zwei „Neutralgläser" (von Schott und Gen., Mainz) eingesetzt werden. Diese „Neutralgläser" (verwendet werden zur Zeit die Gläser NG 3, 4, 5, 9, 11; 1 bzw. 2 mm dick, Format 5 × 5 cm) dienen der Grobregulierung der Strahlungsintensität. Sie werden durch einen Luftstrom gekühlt.

d) Die Umgebung der brennenden Lampe (also der Bereich des Kondensorsystems) erhitzt sich sehr stark. Diese Wärme muß abgeführt werden. In den Projektor ist hierfür ein sehr wirksames Kühlgebläse eingebaut. Durch einen Ventilator wird Luft angesaugt, die die wichtigen optischen Teile umströmt (kurze Pfeile in Abb. 4). Auch das Interferenzfilter wird angeblasen. Das Kühlsystem bewirkt (bei Bedarf unterstützt von einem beweglichen Ventilator, der das Projektorgehäuse von außen kühlt), daß auch bei höchster Belastung der Lampe und stundenlanger Bestrahlung sich der Interferenzfilterhalter und damit das Interferenzfilter kaum meßbar über die Temperatur der Luft erwärmen. Die aus den Projektoren ausgeworfene Warmluft wird durch ein Abzugsystem abgesaugt (vgl. Abb. 3). Der Ventilator wird durch einen Kleinstmotor angetrieben. Motor und Lampe sind parallel geschaltet. Zur Zeit nehmen wir noch folgenden betriebstechnischen Nachteil in Kauf: Brennt eine Lampe während des Betriebs durch, so muß die Stromzufuhr zum Projektor möglichst schnell abgeschaltet werden, da die plötzliche Abkühlung durch den weiterlaufenden Ventilator unter Umständen die

optischen Teile beschädigen könnte. Beschädigte optische Teile können leicht ausgewechselt werden!

e) Die Einstellung der gewünschten Strahlungsintensität wird grob mit Hilfe der Neutralgläser vorgenommen. Die Feinregulierung dagegen geschieht durch eine Veränderung des Lampenstroms (also der Temperatur des Glühkörpers) über den Reguliertransformator (Spannungsablesung). In den meisten Fällen brennen die Lampen zwischen 94 und 100 V.

6. Die Messung der Strahlung

Wir verwenden hierzu ein Thermosäulen-Galvanometersystem.

a) Thermosäule. Großoberflächen-Thermosäule E_1 von Kipp und Zonen, Delft, Holland (80 Elemente, Constantan-Manganin; nahezu kreisförmige Empfängerfläche mit Durchmesser 20 mm; die Intensitätsempfindlichkeit, die nach den Angaben der Hersteller berechnet wurde, wäre $\frac{0{,}50\,\mathrm{V}\cdot\mathrm{cm}^2}{\mathrm{W}}$. Dies stimmt sehr gut mit den Resultaten unserer absoluten Eichung [vgl. unten] überein). Genaue Angaben über die spektrale Absorption des verwendeten Schwärzungsmittels im mittleren Infrarot konnten wir von den Herstellern bisher nicht erhalten. Die Thermosäule ist (ohne Reflektor) in ein genau würfelförmiges und mit einem Verschluß ausgestattetes Holzgehäuse eingebaut (Wärmeisolierung!) und an sich nur für die Messung praktisch paralleler Strahlung eingestellt. Jedoch kann auch divergente Strahlung ohne Fehler gemessen werden, falls die optische Achse des divergierenden Strahlenbündels durch die Mitte der Empfängerfläche geht. Dies ist in der Mitte der von uns benützten bestrahlten Kreisfläche der Fall (vgl. Abb. 4). Deshalb wird die Thermosäule bei der Intensitätsmessung in den Bestrahlungskästen stets so justiert, daß sie in der Mitte des bestrahlten Kreises steht. Wir vergleichen also stets die Intensitäten, die auf einen Kreis (Durchmesser 20 mm) treffen, durch dessen Mittelpunkt die optische Achse des von uns benützten, leicht divergenten Strahlenbündels geht. Das Glasfenster, mit dem die Thermosäule normalerweise ausgestattet ist, entspricht den Glasplatten, mit denen unsere Reaktionsgefäße abgedeckt werden.

b) Galvanometer. Verwendet werden die bekannten Multiflex-Galvanometer vom Typ MG 0 (Lange, Berlin, vgl. die einschlägigen Broschüren dieser Firma). Wir benützen zur Zeit zwei Instrumente, die sich in ihrer „Empfindlichkeit" stark unterscheiden (1. Instrument: 1 Skalenteil (Stellung 1:1) = 141 erg/cm² · sec, 2. Instrument (Sonderanfertigung): 1 Skalenteil (Stellung 1:10) = 62,2 erg/cm² · sec). Damit können wir alle Strahlungsintensitäten, die zur Zeit bei uns vorkommen, mit hoher Genauigkeit messen.

c) Die Eichung. Das System Thermosäule-Galvanometer wird mit einer in den USA gekauften, gealterten Kohlenfaden-Eichlampe

(sekundärer Standard) des National Bureau of Standards geeicht. Über die Technik der Eichung findet man wichtige Angaben und Vorschriften in den der Lampe beigefügten Merkblättern des National Bureau of Standards sowie bei Stair und Johnston (1954) und Withrow und Withrow (1956). Wir folgen bei der Eichung nicht genau den Empfehlungen des National Bureau of Standards, sondern verwenden eine ähnliche Methode, wie sie Withrow und Withrow (1956) beschrieben haben (Verwendung eines Eichkastens). Wir haben bisher Wechselstrom (50 Hz) benutzt. Eingestellt wird der Strom, der durch die Eichlampe geht (Drehschalter-Feinmeßwiderstand, Klasse 0,02, von Ruhstrat, Göttingen, frisch geeichtes Amperemeter, Typ Multavi II, Genauigkeitsklasse 1,5 für sinusförmigen Wechselstrom von 50 Hz, von Hartmann und Braun, Frankfurt). Beim Eichvorgang wird das Fenster der Thermosäule entfernt.

7. Hellrot- und Dunkelrot-Felder

Da es bei unseren Untersuchungen oft notwendig ist, vor oder nach der monochromatischen Strahlung Hellrot bzw. Dunkelrot zu geben, so sind in der Kammer 1 kleine, streng standardisierte und reproduzierbare Anlagen für Hellrot bzw. Dunkelrot eingerichtet (zwischen diesen Anlagen, wie auch zwischen ihnen und den Bestrahlungskästen ist praktisch kein Austausch von Streulicht möglich). Die von uns benützten, weitgehend homogen ausgeleuchteten Felder sind relativ klein, für unsere derzeitigen Untersuchungsobjekte (frühe Keimlingsstadien bzw. Kryptogamen) aber vollkommen ausreichend.

a) Hellrot-Feld. Als Strahlungsquellen dienen 3 Leuchtstoffröhren (120 cm lang), die praktisch nur Strahlung zwischen 600 und 700 mμ emittieren (Philips, Leuchtstoffröhren, TL 40 W/15, vgl. Abb. 6). Diese Röhren sind nahezu ideale Strahlungsquellen für Hellrot. Nach den Angaben der Firma Philips, nach Messungen des Laboratoire Central d'Electricité in Brüssel sowie nach unseren eigenen spektroskopischen Beobachtungen haben diese Röhren mindestens zwischen 350 und 600 mμ keine feststellbare Emission. Wollen wir ganz sicher sein, daß keinerlei kurzwelliges Streulicht vorhanden ist, so benützen wir zwischen den Röhren und den Objekten ein Streulichtfilter für kurzwelliges Streulicht (2 Lagen rotes Dupont-Cellophan, von der Dupont Company, Wilmington, Delaware, USA). Die absolute Intensität der Strahlung, die in dem Hellrot-Feld z. B. auf einen keimenden Samen fällt, kennen wir nicht genau, da unsere Thermosäule stark konvergente Strahlung nicht zuverlässig genug mißt (Abweichung vom Cosinus-Gesetz). Wir können die *Konstanz* der Strahlung jedoch mit hoher Präzision kontrollieren. Mit der Großoberflächenthermosäule E_1 messen wir (unter Zwischenschaltung von 2 mm KG 1) 1400 erg/cm^2 · sec (senkrecht unter der Mitte

der mittleren Röhre). Die „wahre" Intensität dürfte etwas höher liegen. Benützen wir statt der „roten" Leuchtstoffröhren „weiße" (zwei HNT 202/40 W, eine HNW 202/40 W, beide Typen von Osram), so haben wir ein „Weißlichtfeld", das mit 3100 ± 150 Lux ausgeleuchtet ist (Messung mit dem großen Beleuchtungsmesser I mit Photozelle S 145 von Lange, Berlin; der „Cosinus-Fehler" dieses Instruments dürfte bei den in unserem Fall vorkommenden Winkeln gering sein).

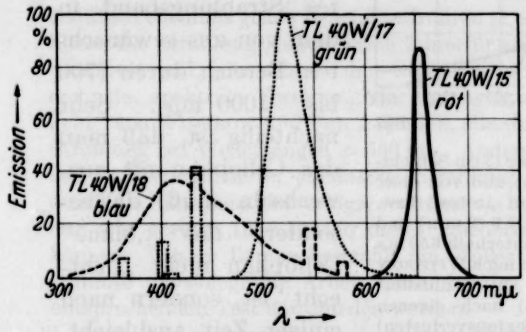


Abb. 6

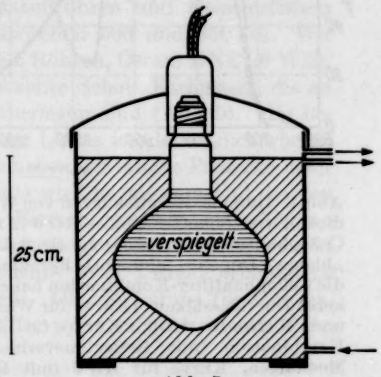


Abb. 7

Abb. 6. Die relative spektrale Verteilung der Emission einiger, für uns wichtiger Philips-Leuchtstofflampen. Die Emission der grünen Leuchtstofflampe TL 20/40 W/17 bei $\lambda = 522$ mμ ist = 100 % gesetzt (Bezugssystem). Die Lampen wurden im Laboratoire Central d'Electricité in Brüssel durchgemessen. Dr. PIQUER, Brüssel, stellte uns die Meßergebnisse, auf denen die hier angegebenen Kurven beruhen, zur Verfügung

Abb. 7. Medianer Längsschnitt durch den Wasserkühler mit Altrilux-Reflektorlampe (Philips, 500 W, 220 V). Die Pfeile geben die Strömungsrichtung des Wassers an. An die obere der beiden Ausflußöffnungen ist eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Seitlich und nach oben ist der Kühler lichtdicht verschlossen

Wir können „Weißlicht" auch dadurch herstellen, daß wir eine „rote" Leuchtstoffröhre (Philips TL 40 W/15), eine „grüne" (Philips TL 40 W/17) und eine „blaue" (Philips TL 40 W/18) zusammen benützen (vgl. Abb. 6). Zuweilen kann es von Vorteil sein, wenn man auf einfachste Weise zeigen kann (natürlich nur halbquantitativ), wie sich die weitgehende Eliminierung bestimmter Spektralbereiche (Wegnahme von 1 oder 2 Röhren, Vergleich mit der kombinierten Wirkung der 3 Röhren) auswirkt.

b) Dunkelrot-Feld. Interessiert sind wir an Strahlung zwischen 700 und 800 (—1000) mμ. Wir verwenden als Strahlungsquellen eine Altrilux-Reflektorlampe (Philips, 500 W, 220 V, Temperatur des Glühfadens etwa 2750° K), die wir mit strömendem Wasser kühlen (Abb. 7). Die Ausstrahlung der Lampe geht dann durch eine Wasserschicht, die mindestens 3 cm dick ist (wegen der Wölbung der Lampe kann bei unserer Anordnung die wirksame Wasserschicht nicht konstant tief sein, vgl. Abb. 7). Strahlung über 1400 mμ wird dabei vollständig absorbiert, zwischen 800 und 1400 mμ ein erheblicher Teil (Abb. 8). Die derart gefilterte Strahlung geht durch eine Glasplatte und durch je 2 Lagen

rotes und blaues Cellophan (von Dupont Company, Wilmington, Delaware, USA). Die Folien sind so gelegt, daß die leicht feststellbaren Vorzugsrichtungen keine Winkel bilden. Wie man aus der Abb. 8 entnehmen kann, läßt diese Kombination (Wasser und Cellophan) ein breites Strahlungsband in dem von uns gewünschten Bereich durch (700 bis 1000 mμ). Sehr nachteilig ist, daß man das Cellophan oft auswechseln muß, da besonders das „blaue" Cellophan nicht „lichtecht" ist, sondern nach einiger Zeit ausbleicht. Wir haben ferner festgestellt, daß die Cellophan-Filter das Licht beträchtlich polarisieren. Dies kann unter Umständen ebenfalls stören. Wir wollen deshalb in Zukunft das Schottfilter RG 9 (2 mm), das als Tafelglas in der von uns benötigten Größe erhältlich ist, zur Isolierung des Dunkelrot anstelle der Cellophanfilter-Kombination verwenden (Abb. 8). Das von uns benützte Dunkelrot-Feld (etwa 38 cm Durchmesser) befindet sich 81 cm unterhalb des unteren Kühlerrandes. Das Dunkelrot-Feld liegt horizontal und ist relativ homogen ausgeleuchtet. Die optische Achse verläuft vertikal. Geht die optische Achse durch die Aufnahmefläche der Thermosäule E_1, dann messen wir (mit der Cellophanfilter-Kombination) rund 16000 erg/cm² · sec.

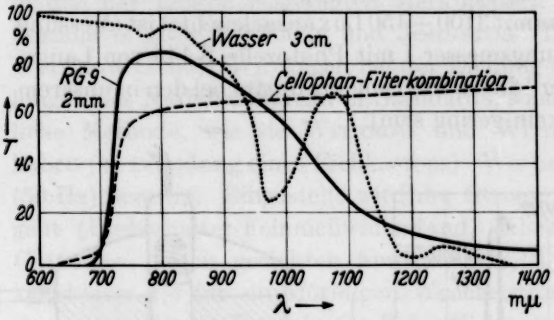


Abb. 8. Durchlässigkeitskurven von Wasser (3 cm Schichtdicke), von Schott-Farbglas RG 9 (2 mm) und von einer Cellophanfilter-Kombination (je 2 Lagen „rotes" bzw. „blaues" Dupont Cellophan). Farbglas RG 9 (2 mm) und die Cellophanfilter-Kombination haben unterhalb 650 mμ keine Durchlässigkeit. (Kurve für Wasser nach Withrow und Withrow 1956, Kurve für die Cellophanfilter-Kombination (mit Reflexionsverlusten) nach eigenen Messungen, Kurve für RG 9 (mit Reflexionsverlusten) nach eigenen Messungen und nach den Angaben von Schott und Gen., Mainz)

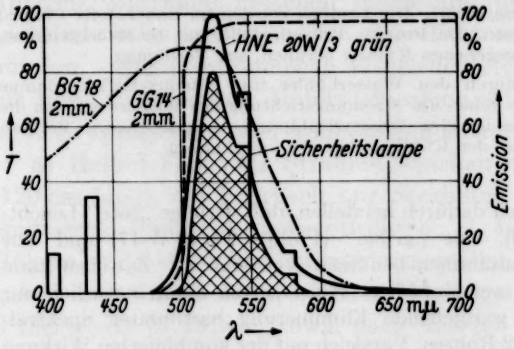


Abb. 9. Die relative, spektrale Verteilung der von der „Sicherheitslampe" ausgehenden Strahlung. (Die Durchlässigkeitskurven der Farbgläser sind, ohne Berücksichtigung der Reflexionsverluste, nach den Angaben von Schott und Gen., Mainz, gezeichnet, die Emissionskurve der Leuchtstoffröhre nach einer entsprechenden Kurve von Osram). Die Strahlung der Leuchtstoffröhre geht durch beide Filter

8. Sicherheitslampe

Zuweilen ist es notwendig, an einem Versuchsmaterial, das im Dunkeln gehalten werden soll, mehr oder weniger kurzfristige Manipulationen vorzunehmen, bei denen man etwas sehen muß. Wir haben versucht, für diese Zwecke eine „Sicherheitslampe" herzustellen, die nur Strahlung emittiert, die auf die Pflanzen sehr wenig feststellbaren Einfluß hat und für die das menschliche Auge hochempfindlich ist. Der grün-gelbe Spektralbereich ist hierfür am besten geeignet (vgl. die Zusammenstellung bei WITHROW und PRICE 1957). Die eben genannten Autoren haben ein „safe-light" beschrieben, das aus grünen Leuchtstoffröhren und Gelatinefiltern besteht. Es emittiert praktisch nur Strahlung zwischen 500 und 550 mμ. Wir benützen ebenfalls grüne Leuchtstoffröhren (1 oder 2 Röhren, Osram HNE 20 W/3), filtern die Strahlung jedoch durch 2 hierfür ausgesuchte Schott-Farbgläser, die an Stabilität und Lebensdauer den Gelatinefiltern überlegen sind (Abb. 9). Die berechnete, spektrale Verteilung des durchgelassenen Lichts ist dem „Sicherheitslicht" von WITHROW und PRICE ähnlich, allerdings haben wir etliche Prozente mehr Strahlung bei Wellenlängen > 550 mμ. Andererseits wird in unserem Fall die von der Lampe emittierte, *gewünschte* Strahlung im Bereich zwischen 500—550 mμ durch die Filter sehr viel weniger reduziert als bei WITHROW und PRICE. Man braucht nur sehr geringe Intensitäten dieses „Sicherheitslichts", um korrekt arbeiten zu können. Unsere Lampe bestrahlt ein großes Areal. Ob die Lampe für eine bestimmte physiologische Arbeit brauchbar ist, sollte, wenn möglich, durch einen entsprechenden Test entschieden werden.

9. Diskussion

Wie jede Anlage zur Erzeugung monochromatischer Strahlung ist auch die unsrige eine Kompromißlösung zwischen den Ansprüchen an Intensität und spektrale Reinheit. Wir können die spektrale Reinheit sehr stark verbessern, wenn wir Interferenz-Doppellinienfilter verwenden. Wir „verlieren" dabei aber erheblich an Intensität. Für unsere Untersuchungen über das Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem in Keimpflanzen (MOHR 1958, MOHR und LÜNENSCHLOSS 1958) benötigen wir jedoch unbedingt relativ hohe Intensitäten. Wollen wir die spektrale Reinheit steigern, ohne an Intensität zu verlieren, so müssen wir Strahlungsquellen höherer Leistung verwenden. Wir benötigen vor allem höhere Intensität im kurzwelligen Bereich des von uns benützten Spektrums. Da wir gegenwärtig bei unseren Experimenten bei allen Wellenlängen die gleiche Zahl von Quanten während einer konstanten Zeit einstrahlen, so müssen wir als Bezugswert die Intensität wählen, die wir bei der kürzesten, von uns verwendeten Wellenlänge erzielen können. Unsere Strahlungsquellen (Glühfäden) strahlen ja um so weniger Energie ab, je kürzer die Wellenlänge ist. Die Intensität, die wir bei unseren derzeitigen Studien über Wirkungsspektren anwenden können, wird also bestimmt durch die Intensität, die wir mit dem Filter der kürzesten Wellenlänge (zur Zeit 412 mμ) erzielen.

Wir wollen versuchen, Projektionssysteme bauen zu lassen, in die Xenon-Hochdruck-Lampen als Strahlungsquellen eingebaut sind und mit denen wir in der Bildebene arbeiten können (Abbildung der Lochblende). Die Linsen sollen aus

Quarz bestehen. Wir hoffen, damit nicht nur den Spielraum der zur Verfügung stehenden Intensitäten nach oben hin zu vergrößern, sondern uns damit auch die Möglichkeit zu verschaffen, im nahen Ultraviolett (bis etwa 340 mμ) mit relativ hohen Intensitäten arbeiten zu können (unter Benützung eines kontinuierlichen Spektrums!). Auch glauben wir, daß wir dann bei relativ hoher Intensität mit Doppellinienfiltern arbeiten können.

Die in dieser Arbeit beschriebene Anlage wurde für photobiologische Untersuchungen an frühen Keimlingstadien und an Kryptogamen gebaut. Hierfür genügt die weitgehend homogen ausgeleuchtete Kreisfläche vom Durchmesser 50 mm. Für andere Objekte bräuchte man größere, homogen ausgeleuchtete Flächen. Diese dürften wohl am günstigsten dadurch zu erzielen sein, daß man in der Bildebene eines Objektivs mit kürzerer Brennweite arbeitet. Freilich wird man sich dann mit geringeren Intensitäten begnügen müssen.

Die einzige, bisher beschriebene Anlage, mit der wir die unsrige unmittelbar vergleichen können, ist die schon öfters erwähnte Anlage von Withrow (1957). In dieser Anlage wird in der Bildebene des Objektivs gearbeitet. Es wird die Öffnung der Kondensorlinse abgebildet. Die ähnlich homogen wie bei uns ausgeleuchtete Fläche ist erheblich größer (Kreis von etwa 15 cm Durchmesser), die erzielten Intensitäten sind aber offenbar wesentlich geringer als bei uns. Geringer als bei Withrow ist bei uns der Winkel, um den die nicht achsenparallelen Strahlen des Lichtbündels beim Durchtritt durch das Interferenzfilter von der optischen Achse abweichen, und sehr viel geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß Streulicht ins Objektiv gelangt. Nachteilig in dem Withrowschen System erscheint uns auch das Fehlen des Reflektors und die Anordnung der Luftkühlung. Die Filtersysteme, die Withrow anstelle der von uns verwendeten Farbgläser (mit den Interferenzfiltern bereits verkittet) bzw. anstelle des KG 1 verwendet, sind sehr viel schwieriger zu handhaben und wahrscheinlich auch nicht zuverlässiger. Ein großer Vorzug scheint uns zu sein, daß sich bei uns die Strahlungsquellen und die sich erhitzenden Teile des optischen Systems außerhalb der Versuchsdunkelkammern befinden und daß in die Kammern selbst nur die monochromatische Strahlung gelangt.

Zusammenfassend wollen wir betonen, daß wir unsere Anlage lediglich für einen ersten Versuch halten, das Problem der Erzeugung monochromatischer Strahlung höherer Intensität mit Hilfe von Interferenzfiltern zu lösen. Wir halten die Anlage keineswegs für ideal. Wir werden uns bemühen, sie zu verbessern. Für jede Kritik und für jeden Hinweis auf Fehlerquellen und Verbesserungsmöglichkeiten werden wir dankbar sein.

Summary

A recently designed interference-filter monochromator system for biological purposes is described (spectral range: 400—800 mμ). The system contains 6 monochromator units. It operates with projection lamps (500 or 750 W) as sources of radiation. In each unit the optical

system of a high-power projector (Prado 500, Leitz) is used. The irradiances which can be obtained with a single interference-filter are rather high: about 1500 ergs/cm^2 · sec at 412 mμ, about 14000 ergs/cm^2 · sec at 613 mμ. — In addition to the monochromator system the designs of standard-fields of radiation for red and far-red are presented and data are given concerning a sensitive thermopile Multiflex-galvanometer system. The design is compared in principle with the spectrograph (introduction) and more in detail with the interference-filter monochromator system presented by WITHROW (1957).

Herrn Professor Dr. E. BÜNNING, der den Bau der Anlage grundsätzlich ermöglicht und beständig gefördert hat, danken wir herzlich. Wir danken auch Herrn Mechanikermeister SPEIDEL, dem Leiter der feinmechanischen Werkstatt des Physikalischen Instituts der Universität Tübingen, und Herrn SCHAAL, dem Schreiner unseres Instituts, für ihre wertvolle Mitarbeit. Auch gebührt Dank den Firmen, die uns Einzelteile geliefert haben, für ihr verständnisvolles Entgegenkommen.

Literatur

BORTHWICK, H. A., and S. B. HENDRICKS: Effects of radiation on growth and development. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 16. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer (in Vorbereitung). — GEFFCKEN, W.: Neuartige Interferenzlichtfilter. Z. angew. Chem. A **60**, 1—4 (1948). — GREENLAND, K. M.: Interference filters in optics. Endeavour **11**, 143—148 (1952). — MOHR, H.: Die Beeinflussung der Keimung von Farnsporen durch Licht und andere Faktoren. Planta (Berl.) **46**, 534—551 (1956a). — Die Abhängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei Farnen vom Licht. Planta (Berl.) **47**, 127—158 (1956b). — Neue Studien über morphogenetisch wichtige Pigmentsysteme in Pflanzen. Naturwiss. **45**, 448—449 (1958). — Photomorphogenetische Reaktionssysteme in Pflanzen. Teil 1. In: Ergebnisse der Biologie, Bd. 22. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer (in Druck). — MOHR, H., u. A. LÜNENSCHLOSS: Weitere Studien zur Photomorphogenese der Keimlinge von *Sinapis alba* (L.) Naturwiss. **45**, 578—579 (1958). — MONK, G. S., and C. F. EHRET: Design and performance of a biological spectrograph. Radiat. Res. **5**, 88—106 (1956). — PARKER, M. W., S. B. HENDRICKS, H. A. BORTHWICK and N. J. SCULLY: Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of short-day plants. Bot. Gaz. **108**, 1—26 (1946). — *Jenaer Glaswerk Schott und Gen.:* Schott-Interferenzfilter. Mainz 1957. — STAIR, R., and R. G. JOHNSTON: Effect of recent knowledge of atomic constants and of humidity on the National Bureau of Standards thermal-radiation standards. J. Res. nat. Bur. Stand. **53**, 211—215 (1954). — TURNER, A. F.: Some current developments in multilayer optical films. J. Phys. Radium (Paris) **11**, 444—460 (1950). — WITHROW, R. B.: An interference-filter monochromator system for the irradiation of biological material. Plant Physiol. **32**, 355—360 (1957). — WITHROW, R. B., and A. P. WITHROW: Generation, control, and measurement of visible and near-visible radiant energy. In: Radiation Biology, vol. III, A. HOLLAENDER edit. New York: McGraw Hill Book Comp. 1956. — WITHROW, R. B., and L. PRICE: A darkroom safelight for research in plant physiology. Plant Physiol. **32**, 244—248 (1957). — WITHROW, R. B., H. W. KLEIN and V. ELSTAD: Action spectra of photomorphogenic induction and its photoinactivation. Plant Physiol. **32**, 453—462 (1957).

Dr. H. MOHR und Dr. G. SCHOSER,
Tübingen, Botanisches Institut der Universität

Planta, 53, 18—24 (1959)

Botanisches Institut der Universität Tübingen

ÜBER DIE PHYSIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN VON GEWEBEKULTUREN AUS TUMOR- UND NORMALEM GEWEBE VON *PICEA GLAUCA*

Von

J. Reinert und H. Schraudolf

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Dezember 1958)

Für pflanzliche Tumorgewebe gilt die Regel, daß sie ohne Zusatz von Auxinen isoliert und in vitro kultiviert werden können. Das hat sich sowohl für Tumoren genetischen Ursprungs als auch für andere gezeigt, die durch *Agrobacterium tumefaciens* induziert werden können (White 1951, Gautheret 1955, Braun und Stonier 1958). Ein Ausnahmefall ist Tumorgewebe aus *Picea glauca*, das — im Gegensatz zum normalen Gewebe — nur isoliert werden konnte, wenn das Nährmedium hohe IES-Konzentrationen enthielt (Reinert und White 1956). Bei den gleichen Versuchen hatte es sich auch gezeigt, daß die Tumorkulturen bedeutend höhere Ascorbinsäurezusätze zum Wachstum benötigen als die normalen Gewebe. Da diese Ergebnisse wegen der besonderen Verhältnisse bei der Isolierung — große Wundflächen und dadurch gesteigerte Oxydationsprozesse, durch die sowohl Auxin als auch Ascorbinsäure verbraucht werden können — nicht ohne weiteres für Calluskulturen gültig sein müssen, ist in der vorliegenden Arbeit überprüft worden, ob es sich bei den Geweben aus Tumoren von *Picea glauca* in Hinsicht auf den Auxinbedarf um eine echte Ausnahme von der oben erwähnten Regel handelt.

Methodik

Als Untersuchungsmaterial dienten Kulturen aus normalem und Tumorgewebe von *Picea glauca*, die seit 1954 isoliert und subkultiviert worden sind (Reinert und White 1956). Die Kulturbedingungen sind schon beschrieben worden. Die Zusammensetzung des Nährmediums geht aus der Tabelle 1 hervor. Für die vorliegenden Versuche waren einige geringfügige Abänderungen notwendig: So wurde, um photochemische Umsetzungen während des Versuchs weitgehend auszuschließen, der Nährlösung kein Riboflavin zugesetzt. Darüber hinaus erwies sich ein Zusatz von Ascorbinsäure (10^{-5} g/ml) für die Kultur der Tumorgewebe als unbedingt notwendig, während ein derartig hoher Vitamin C-Gehalt der Nährlösung für die normalen Gewebe auf Dauer zu hoch war und toxisch wirkte.

Zur Bestimmung der Auxinabhängigkeit des Wachstums kamen zu den Grundmedien jeweils steigende Konzentrationen von Indolylessigsäure (IES, Merck 353),

Tabelle 1 (REINERT und WHITE 1956)

a) White's Medium

b) Inosit . . . . . 10^{-4} g/ml
Cholin . . . . . 10^{-5} g/ml
Riboflavin . . . . . 10^{-7} g/ml
Ascorbinsäure . . . . . 10^{-7} g/ml
Biotin . . . . . 10^{-8} g/ml
Hypoxanthin . . . . $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ g/ml
Ca-Pantothenat . . . . 10^{-7} g/ml

d) Für normale Kulturen:
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure . . . . . $5 \cdot 10^{-8}$ g/ml

für Tumorkulturen:
β-Indolylessigsäure . . 10^{-5} g/ml
Ascorbinsäure . . . . 10^{-5} g/ml

c) Aminosäuren:
L-Lysin . . . . . 15,6 mg/l
DL-Methionin . . . . . 13,0 mg/l
L-Threonin . . . . . 6,5 mg/l
DL-Valin . . . . . 13,0 mg/l
L-Arginin HCl . . . . . 7,8 mg/l
L-Histidin HCl . . . . . 2,6 mg/l
L-Prolin . . . . . 5,0 mg/l
L-Glycin . . . . . 10,0 mg/l
DL-Isoleucin . . . . . 10,4 mg/l
L-Phenylalanin . . . . 2,5 mg/l
L-Leucin . . . . . 12,6 mg/l
L-Tryptophan . . . . . 4,0 mg/l
L-Cystin . . . . . 1,5 mg/l
L-Glutaminsäure . . . . 14,0 mg/l
L-Asparaginsäure . . . . 6,0 mg/l
L-Glutamin . . . . . 50,0 mg/l
L-Asparagin . . . . . 20,0 mg/l
L-Tyrosin . . . . . 40,0 mg/l

die nur bei der höchsten der angewendeten Konzentrationen (10^{-3} g/ml Nährlösung) als Kaliumsalz geboten wurde. Bei der hohen Pufferkapazität der Nährlösungen blieb ihr ursprünglicher p_H-Wert auch bei den höchsten Zusätzen von reiner Indolylessigsäure (10^{-4} g/ml) unverändert. Das Maß für das Wachstum der Kulturen war die Frischgewichtszunahme. Vorversuche zeigten dabei, daß es zur Erzielung einer der Wägegenauigkeit entsprechenden Gewichtskonstanz genügt, die mit Nährlösung mehr oder weniger imbibierten Kulturen jeweils vor dem Wiegen für 1 bis maximal 2 min auf mehrere Lagen sterilen Filtrierpapiers zu übertragen und so die überschüssige Flüssigkeit abzusaugen.

Gewogen wurde in sterilen Stanniolbechern an einer Torsionswaage mit einer Genauigkeit von $\pm 0{,}5$ mg. Nach dem Wägen wurden die Kulturen sofort auf die ursprüngliche Nährlösung zurückgebracht. Der Ausfall durch Infektion lag bei dieser Methode unter 1%.

Die größte Schwierigkeit für die Messung von Wachstumsunterschieden bei Gewebekulturen liegt in der Auswahl vergleichbaren Materials, da den Ausgangskulturen möglichst gleichmäßig wachsende Tochtercalli entnommen werden müssen, ohne daß dabei eine Selektion in Richtung auf einen bestimmten Gewebetyp erfolgt. Dies trifft besonders auf die von uns untersuchten Picea-Kulturen zu, die keine geschlossene Wachstumszone haben und bei denen die Wachstumsintensität einzelner Bezirke der Ausgangscalli nicht ohne weiteres zu erkennen ist. Eine einfache Aufteilung der Ausgangskulturen in etwa gleich große Gewebestücke führt selten zu einer befriedigenden gleichmäßigen Wachstumsrate der Subkulturen. Um diese methodischen Schwierigkeiten zu umgehen, wurde zu einer auch aus anderen Gründen notwendigen Vorkultur (s. unten) jeweils die doppelte Zahl der für den Versuch benötigten Kulturen angesetzt. Aus diesen vorkultivierten Geweben konnten dann Kulturen mit etwa gleicher Wachstumsgeschwindigkeit ohne weitere Unterteilung in Versuch genommen und dadurch gleichzeitig ein eventuell störender Wundeffekt ausgeschlossen werden. Mit Hilfe dieser Bedingungen ließen sich Streuungen in der Wachstumsrate der einzelnen Kulturen unter gleichen Bedingungen zwar nicht vollständig ausschließen, aber doch so weit reduzieren, daß bei einer Verwendung von jeweils 10 Kulturen für jede Wuchsstoffkonzentration die gemessenen Unterschiede im Frischgewicht statistisch gesichert werden konnten.

Ergebnisse

Zu Anfang der Versuche hatte es sich ergeben, daß eine deutliche Abhängigkeit der Zuwachsrate von der Wuchsstoffkonzentration in der Nährlösung erst 2 Wochen nach Versuchsbeginn festgestellt werden konnte, wenn die Kulturen bei einem Übertragungscyclus von 3 Wochen von Nährlösungen mit optimalem Wuchsstoffgehalt (10^{-5} g/ml IES für Tumorgewebe, $5 \cdot 10^{-8}$ g/ml 2,4-D für normale Gewebe) ohne weiteres auf Nährlösungen mit unterschiedlichen IES-Konzentrationen übertragen wurden (Abb. 1). Die Ursache für diesen Effekt ist offenbar eine Speicherung des Auxins in den Kulturen und seine Mobilisierung während der ersten beiden Wochen nach Versuchsbeginn (unveröffentlichte Ergebnisse). Es war deshalb nötig, die Auxinreserve der Gewebe durch eine 14tägige Vorkultur auf auxinfreiem Medium zu reduzieren. Erst dann war schon in den ersten Tagen nach Versuchsbeginn eine deutliche Abhängigkeit der Wachstumsrate vom Wuchsstoffgehalt der Nährlösung nachweisbar (Abb. 1).

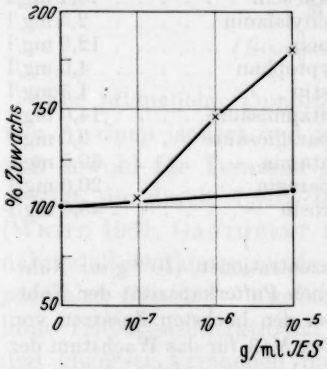
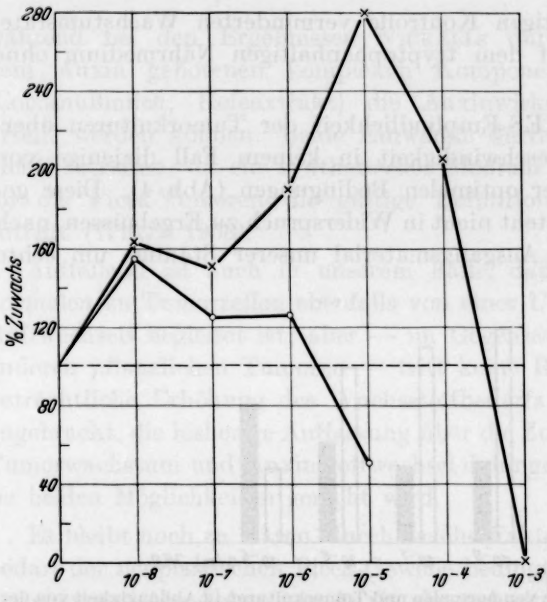


Abb. 1. Frischgewichtszunahme von Tumorkulturen in Abhängigkeit von der IES-Konzentration. Kulturdauer: 14 Tage. •——• Übertragen von Nährlösungen mit 10^{-5} g/ml IES; ×——× Kulturen nach 14tägiger Vorkultur auf IES-freiem Medium. Abszisse: IES-Konzentration in g/ml. Ordinate: Frischgewichtszunahme in %, bezogen auf Zuwachs in IES-freiem Medium = 100 %

Diese Abhängigkeit der Frischgewichtszunahme vom Auxinspiegel der Nährlösung war bei beiden Geweben vorhanden. Bei den Tumorkulturen lag das Optimum der Förderung bei 10^{-5} g/ml IES, während die normalen Gewebe das Maximum der Frischgewichtszunahme bei einer bedeutend niedrigeren IES-Konzentration (10^{-8} g/ml IES) erreichten. Der Verlauf der Wachstumskurven und die statistische Sicherung des Kurvenverlaufs nach dem t-Test (Pätau 1943) ist in Abb. 2 dargestellt.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß die Tumorkulturen — im Gegensatz zu der Beobachtung bei der Isolierung — noch bei der unphysiologisch hohen IES-Konzentration von 10^{-4} g/ml eine deutliche Wachstumsförderung gegenüber der wuchsstofffreien Kontrolle zeigen. Bei mehreren Wiederholungen der Versuche wurden zwar Unterschiede in der absoluten Zuwachsrate beider Gewebetypen, jedoch keine Verschiebungen im allgemeinen Verlauf der Wachstumskurven beobachtet. Die Ascorbinsäure, die in den Medien für Tumorgewebe in hoher Konzentration (10^{-5} g/ml) vorliegt, hat keinen Einfluß auf die IES-Empfindlichkeit der Gewebe, denn ihr Entzug führt wohl zum Absterben von etwa 50% der Kulturen nach der ersten Passage, die Reaktion auf



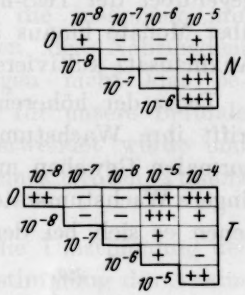


Abb. 2b. Statistische Sicherung der Meßpunkte im t-Test (PÄTAU 1943). − = ungesichert; + = schwach gesichert ($0{,}1 > P > 0{,}002$); + + = gut gesichert ($0{,}002 > P > 0{,}001$); + + + = sehr gut gesichert ($P < 0{,}001$). N = normales Gewebe; T = Tumorgewebe

Abb. 2a. Frischgewichtszunahme von normalen und Tumorkulturen in Abhängigkeit von der IES-Konzentration. Kulturdauer: 14 Tage. o—o normale Kulturen; ×—× Tumorkulturen. Abszisse: IES-Konzentration in g/ml. Ordinate: Frischgewichtszunahme in %, bezogen auf Zuwachs in IES-freiem Medium = 100 %

Auxin und damit der Verlauf der Wachstumskurven bleibt jedoch unbeeinflußt.

Bezieht man — wie in Abb. 2 — die erhaltenen Werte auf die Frischgewichtszunahme der ohne Auxin gewachsenen Kulturen (= 100%), so zeigt sich über die unterschiedlichen optimalen Konzentrationen hinaus eine weit stärkere Auxinabhängigkeit im Wachstum der Tumorgewebe. Bei ihnen läßt sich das Wachstum durch optimale Auxingabe gegenüber der Kontrolle ohne IES um etwa 180%, bei den Normalgeweben nur um rund 50% steigern. Diese stärkere Auxinabhängigkeit der Tumorcalli zeigt sich auch, wenn man versucht, die Gewebe auf IES-freiem Medium zu kultivieren. Obwohl die Nährlösung (vgl. Tabelle 1) 4 γ/ml Tryptophan enthält, kommt es bei den Tumorgeweben zu einer schnellen Abnahme der Zuwachsrate (Abb. 3), die bei der dritten Passage (9 Wochen nach Versuchsbeginn) zu einem Absterben der Kulturen führt. Im Gegensatz hierzu lassen sich die normalen Gewebe, wenn auch mit einer

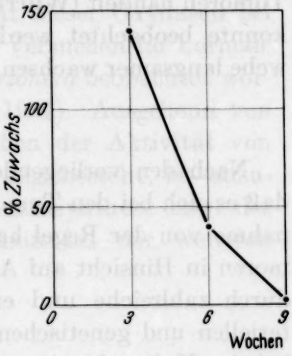


Abb. 3. Wachstum von Tumorkulturen auf IES-freiem Medium über 3 Passagen. Übertragungscyclus 3 Wochen. Abszisse: Zeit in Wochen. Ordinate: Frischgewichtszunahme in %

gegenüber der IES-haltigen Kontrolle verminderten Wachstumsrate, über Monate hinaus auf dem tryptophanhaltigen Nährmedium ohne Auxinzusatz kultivieren.

Trotz der höheren IES-Empfindlichkeit der Tumorkulturen übertrifft ihre Wachstumsgeschwindigkeit in keinem Fall diejenige von normalen Geweben unter optimalen Bedingungen (Abb. 4). Diese geringere Wachstumsrate steht nicht in Widerspruch zu Ergebnissen, nach denen es sich bei dem Ausgangsmaterial unserer Stämme um echte

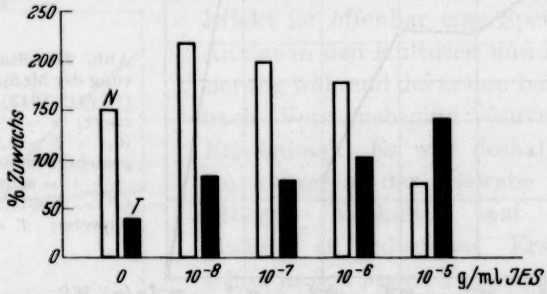


Abb. 4. Frischgewichtszunahme von normalen und Tumorkulturen in Abhängigkeit von der IES-Konzentration. Abszisse: IES-Konzentration in g/ml. Ordinate: Frischgewichtszunahme in % des Ausgangsgewichtes. Weiße Säulen: normale Gewebe. Schwarze Säulen: Tumorgewebe

Tumoren handelt (White 1958), denn auch bei anderen Untersuchungen konnte beobachtet werden, daß in vitro kultivierte neoplastische Gewebe langsamer wachsen als normale (Braun und Stonier 1958).

Diskussion

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann nicht bezweifelt werden, daß es sich bei den Tumorgeweben aus *Picea glauca* um eine echte Ausnahme von der Regel handelt, daß in vitro kultivierte pflanzliche Tumoren in Hinsicht auf Auxin autotroph sind. Diese Regel ist vor allem durch zahlreiche und eingehende Untersuchungen an Tumoren bakteriellen und genetischen Ursprungs gestützt worden, nach denen diese bei der Kultur in vitro entweder kein Auxin benötigen oder sogar dadurch gehemmt werden können (vgl. Braun und Stonier 1958). Es sind schon andere Ausnahmen von dieser Regel festgestellt worden, so das von Demetriades (1953) beobachtete Auxinbedürfnis von Explantaten aus Insektengallen an *Salvia pomifera* und die von Nickell (1953; vgl. auch Gautheret 1955) beschriebene Abhängigkeit des Wachstums von Kulturen, die aus „crown gall" und Virustumoren stammten. Nach Gautheret (1955) können diese Fälle allerdings nicht als echte Ausnahmen gewertet werden, da es sich bei den Insektengallen nicht um Tumoren, sondern offenbar um begrenzt wachsende Neoplasmen handelt,

während bei den Ergebnissen NICKELLS durch die zusammen mit dem Auxin gebotenen komplexen Komponenten der Nährmedien (Cocosnußmilch, Hefeextrakt) die Auxinwirkungen nicht klar beurteilt werden können. Beide Einwände dürften für unsere Befunde nicht zutreffen, da ein synthetisches Medium verwendet wurde und für die Picea-Tumoren die gültige Definition eines echten Tumors zutrifft (WHITE 1958).

Auffallend ist auch in unserem Falle, daß die Umstimmung der normalen zu Tumorzellen ebenfalls von einer Umstimmung des Auxinstoffwechsels begleitet ist; aber — im Gegensatz zu „crown gall" und anderen pflanzlichen Tumoren — tritt keine Reduktion, sondern eine beträchtliche Erhöhung des Wuchsstoffbedarfs ein. Es erscheint also angebracht, die bisherige Auffassung über die Zusammenhänge zwischen Tumorwachstum und Auxinstoffwechsel dahingehend zu revidieren, daß sie beiden Möglichkeiten gerecht wird.

Es bleibt noch zu klären, durch welche Faktoren der erhöhte Auxinbedarf der neoplastischen Picea-Gewebe bedingt ist. Dabei muß sowohl der enzymatische Abbau von Auxin als auch eine veränderte Reaktionsfähigkeit gegenüber Wuchsstoffen berücksichtigt werden. Versuche zur Klärung dieser Punkte sind bis jetzt nur hinsichtlich der Rolle der extracellulären IES-Oxydase durchgeführt worden. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen Produktion und Aktivität dieser Oxydasen bei normalen und bei Tumorgeweben, wie sie z. B. in Versuchen für normale und habituierte Kulturen aus Karotten und *Scorzonera* beobachtet worden sind (REINERT, SCHRAUDOLF und TAZAWA 1957). Ausgehend von der Voraussetzung, daß eine Parallelität zwischen der Aktivität von IES-Oxydasen im Gewebe und in der Nährlösung besteht, ist anzunehmen, daß Änderungen der Fähigkeit zur Auxinsynthese bzw. der Reaktionsfähigkeit der Gewebe gegenüber Auxin bei der weiteren Analyse besondere Beachtung verdienen.

Summary

In contrast to other plant tumor tissues (crown gall and genetic tumors), that from *Picea glauca* can be cultivated in vitro only in the presence of IAA. The auxin requirement for maximal growth of the tumor is appreciably higher (10^{-5} g/ml IAA) than that of normal Picea cultures (10^{-8} g/ml). A similar marked difference is also found in the ascorbic acid requirement, which is 10^{-5} g/ml for neoplastic, but 10^{-7} g/ml for normal tissue. The significance of these results for the characterisation and the in vitro growth of plant tumors is discussed.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Braun, A. C., and T. Stonier: Protoplasmalogia **10** (5a), 1—93 (1958). — Demetriades, S. D.: Extrait Ann. Inst. phytopath. Benaki **7**, 61—67 (1953). — Gautheret, R. J.: Ann. Rev. Plant Physiol. **6**, 433—484 (1955). — Nickell, L. G.: Brookhaven Symposia Biol. **6**, 174—184 (1953). — Pätau, K.: Biol. Zbl. **63**, 152—168 (1943). — Reinert, J., H. Schraudolf u. M. Tazawa: Naturwiss. **44**, 588 (1957). — Reinert, J., and P. R. White: Physiol. Plant. (Coph.) **9**, 177—189 (1956). — White, P. R.: Quart. Rev. Biol. **26**, 1—16 (1951). — Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **44**, 339—344 (1958).

Dr. J. Reinert,
Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstr. 5

Planta, 53, 25—44 (1959)

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

ÜBER DIE WIRKUNGEN VON KOBALT AUF STRECKUNG, ATMUNG UND SUBSTANZEINBAU IN DIE ZELLWAND BEI AVENAKOLEOPTILEN

Von

MARTIN BUSSE

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Januar 1959)

Einleitung

Die Geschichte der Wuchsstofforschung der letzten 20 Jahre ist die Geschichte eines Umwegs, des Umwegs über die Wachstumsatmung. Zumindest steht fest, daß in den Arbeiten der letzten Jahre der Gedanke, daß Wuchsstoff primär die Atmung beschleunigt, nur noch selten auftaucht. Um so häufiger wird dagegen ein Einfluß von Auxin auf den Stoffwechsel der Wandsubstanzen diskutiert (WILSON u. SKOOG 1954; ORDIN, CLELAND u. BONNER 1955, 1957; BUSSE u. KANDLER 1956; SLOCUM u. LITTLE 1957; GLASZIOU 1957; u.a.). Offensichtlich als Vorbereitung für Untersuchungen über einen derartigen Wuchsstoffeffekt wurden inzwischen mehr oder weniger detaillierte Angaben über die Zusammensetzung der Zellwand von Avenakoleoptilen veröffentlicht (BISHOP, BAYLEY u. SETTERFIELD 1958; RAY 1958). Die neueren Arbeiten knüpfen damit an die Gedankengänge aus den Dreißigerjahren an (HEYN 1931).

Wie sehr sich auch durch die raschen Fortschritte der Stoffwechselphysiologie die gedanklichen und methodischen Grundlagen der Wuchsstofforschung erweitert haben, eine klare Vorstellung der Wirkung der Auxine fehlt. Man ist nach wie vor darauf angewiesen, verschiedene Stoffwechselvorgänge gleichzeitig mit der Zellverlängerung zu verfolgen, in der Hoffnung, daß sich daraus Beziehungen ergeben, die Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen Streckung und dem Stoff- und Energiewechsel gestatten. Wenn es gelänge, den Bereich des Stoffwechsels näher zu kennzeichnen, auf den Wuchsstoff unmittelbar einwirkt, wäre eine gewisse Grundlage für die eigentliche, biochemische Bearbeitung des Wuchsstoffproblems geschaffen.

THIMANN (1956) zeigte, daß sich der von MILLER (1951) aufgefundene Kobalteffekt auch an Avenakoleoptilen nachweisen läßt. Während Co^{++} bei Mikroorganismen einige Fermente aktiviert (WARBURG 1948; OGINSKY u. RUMBOUGH 1955), konnte für höhere Pflanzen etwas Entsprechendes bisher noch nicht nachgewiesen werden. Es lag jedenfalls

im Bereich der Möglichkeiten, daß Kobalt nicht einfach als Co-Ferment in die von IES beeinflußten Stoffwechselvorgänge eingreift. Vielmehr war zu vermuten, daß Kobalt eine prinzipiell andere Wirkung ausübt als Wuchsstoff, weshalb die Hoffnung berechtigt erschien, daß sich bei der Untersuchung des Co^{++}-Effekts neue Gesichtspunkte für die Beurteilung der Wuchsstoffwirkung ergeben.

Material und Methodik

Etiolierte Keimpflanzen von *Avena sativa* (Mauerer Weißhafer bzw. Stålhafer) wurden bei etwa 20° C in Brutschränken auf feuchtem Sägemehl herangezogen. Zu dem Zeitpunkt, zu dem die 10 mm langen Zylinder geschnitten wurden, waren die Koleoptilen, wenn nicht anders angegeben, 1,7—2,2 cm lang.

Die Behandlung der Zylinder mit IES und Kobalt ($CoCl_2$) erfolgte in Petrischalen, welche so wenig Flüssigkeit (10 ml) enthielten, daß die Zylinder aus den Lösungen herausragten. Sämtliche Ansätze enthielten Phosphatpuffer 10^{-2} m, p_H 6,0. Die Saccharose-Konzentration war 1%. Die Atmung der Zylinder wurde manometrisch gemessen.

Für die Zellwandanalyse wurden pro Ansatz 120—150 Zylinder verwendet, die in Gruppen zu je 50 ebenfalls in Petrischalen mit den jeweiligen Lösungen behandelt wurden. Jeder Versuch enthielt eine Ausgangsprobe, die sofort nach dem Schneiden der Zylinder verarbeitet wurde. Nach Versuchsende wurde der Zuwachs unter den jeweiligen Bedingungen an je 20 Zylindern bestimmt. Anschließend wurden die Proben 3mal mit 85%igem Alkohol unter Rückfluß gekocht und 2mal mit heißem Aceton extrahiert. Die Zylinder wurden mit Aceton und Äther gewaschen und bei 105° C getrocknet. Das Material blieb dabei fast rein weiß. Anschließend wurden die Zylinder gewogen und in der Reibschale sorgfältig zerrieben. Das Pulver wurde in 50 ml-Meßkölbchen mit 0,05 n H_2SO_4 3,5 Std auf dem Wasserbad extrahiert. Das säureunlösliche Material wurde auf einer Runge-Zentrifuge mehrfach mit Wasser gewaschen und dann in Aceton suspendiert. Das Material läßt sich dann sehr leicht durch Filtertiegel A 3 filtrieren und ergibt nach dem Trocknen ein helles flockiges Pulver. Gebräunte oder pergamentartige Rückstände zeigen an, daß das Material nicht genügend gewaschen und entwässert wurde. Die unlösliche Substanz wurde gewogen. Ein aliquoter Teil wurde für die N-Bestimmung benutzt. Die Resultate sind in mg proteinfreie Substanz pro 100 Zylinder angegeben. Nachdem in der Regel mehr als 100 Zylinder pro Ansatz verwendet wurden, sind die ausgewogenen Differenzen um 20—50% größer als die Angaben in den Tabellen. Die Spörhasewaage erlaubte Ablesungen von 0,1 mg. Vor Beginn der Versuchsreihe wurde der Durchbiegefehler des Waagebalkens korrigiert.

Versuchsergebnisse

1. Streckung und Atmung

a) Konzentrationsabhängigkeit der Co^{++}-Wirkung. Die Angaben von THIMANN (1956) beschränken sich auf Resultate, die durch Kombination verschiedener Konzentrationen von Kobalt mit einer IES-Konzentration erzielt worden waren. Um einen besseren Überblick über die Wirkung von Kobalt zu erhalten, wurde zunächst Kobalt in Konzentrationen von $3 \cdot 10^{-6}$ bis $3 \cdot 10^{-4}$ m mit IES in Konzentrationen von 10^{-7} bis $3 \cdot 10^{-4}$ m kombiniert. Die Versuche wurden mit und ohne

Saccharose (1%) angesetzt. Die Längenmessung erfolgte nach 44 Std (Abb. 1a—d). Bei Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß bei p_H 5,0 die Zylinder in den Proben mit IES 10^{-5} m und Saccharose und ohne Kobalt nach 44 Std häufig schrumpfen und absterben. Der Grund dafür ist wahrscheinlich ein starkes Wachstum von Mikroorganismen, welches in Co^{++}-Gegenwart unterbleibt. Bei p_H 6,0 bleiben die Zylinder auch in langfristigen Versuchen turgeszent, weshalb in der vorliegenden Arbeit ausschließlich bei diesem p_H-Wert gearbeitet wurde. Für die Beurteilung der Abb. 1 ist dies insofern von Bedeutung, als z.B. bei dem für Wachstumsversuche üblichen p_H von etwa 5,0 eine Wuchsstoffkonzentration von $3 \cdot 10^{-4}$ m überoptimal wäre oder toxisch wirken würde.

Die in Abb. 1 a u. b wiedergegebenen Ergebnisse wurden mit Mauerer Weißhafer erzielt; die Abb. 1 c u. d beziehen sich auf Stålhafer. Abb. 1 a u. c gelten für die Ansätze ohne Substrat, Abb. 1 b u. d für Versuche mit Saccharose. Um einen möglichst großen Zuwachs zu erhalten, wurden für diese Versuche Zylinder aus ganz jungen Koleoptilen verwendet (Koleoptillänge 1,3—1,7 cm). Dementsprechend ist der Zuwachs sowohl der Wasserkontrollen als auch der Proben mit IES bzw. IES + Co^{++} sehr groß. Unter optimalen Bedingungen wurde eine Verlängerung der Zylinder auf das 3fache der Ausgangslänge gefunden.

Kobalt allein, ohne Zugabe von Wuchsstoff, wirkt nicht oder, in höheren Konzentrationen, hemmend. Nur in Abwesenheit von Substrat treten bei Kobalt 10^{-5}—$3 \cdot 10^{-5}$ m geringfügige Wachstumsförderungen auf, die aber nicht signifikant zu sein brauchen. Dagegen ergibt sich bei Zugabe von IES regelmäßig ein Co^{++}-Effekt, wobei die Co^{++}-Wirkung um so deutlicher in Erscheinung tritt, je höher die gleichzeitig gebotene IES-Konzentration ist (10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} m). In Kombination mit optimal fördernden Wuchsstoffmengen, unter unseren Versuchsbedingungen 10^{-4} oder $3 \cdot 10^{-4}$ m, verringert sich die Co^{++}-bedingte Streckungsförderung in der Regel wieder beträchtlich (vgl. Abb. 1 b u. d).

Die optimal wirkende Kobaltkonzentration ist ohne Substrat etwa 10^{-4} m und mit Saccharose im allgemeinen 10^{-5}—10^{-4} m. Substrat, zumindest jedoch Saccharose, erhöht also die Empfindlichkeit der Zylinder gegenüber niedrigeren Konzentrationen von Kobalt. Einige Versuche mit Glucose brachten uneinheitliche Resultate; nach den bisherigen Ergebnissen macht es den Eindruck, als ob die Kobalt-Konzentrationskurven mit Glucose mehr denjenigen ohne Substrat gleichen.

Die Versuche mit 2 verschiedenen Hafersorten wurden deshalb durchgeführt, um gegebenenfalls das günstigere Objekt für die weiteren Untersuchungen zu ermitteln. Abb. 1 (a—d) zeigt aber, daß beide Sorten sich im wesentlichen gleichartig gegenüber Wuchsstoff und Kobalt verhalten. Die Unterschiede sind kaum größer als die Differenzen, die sich mit einer Sorte von Versuch zu Versuch ergeben.

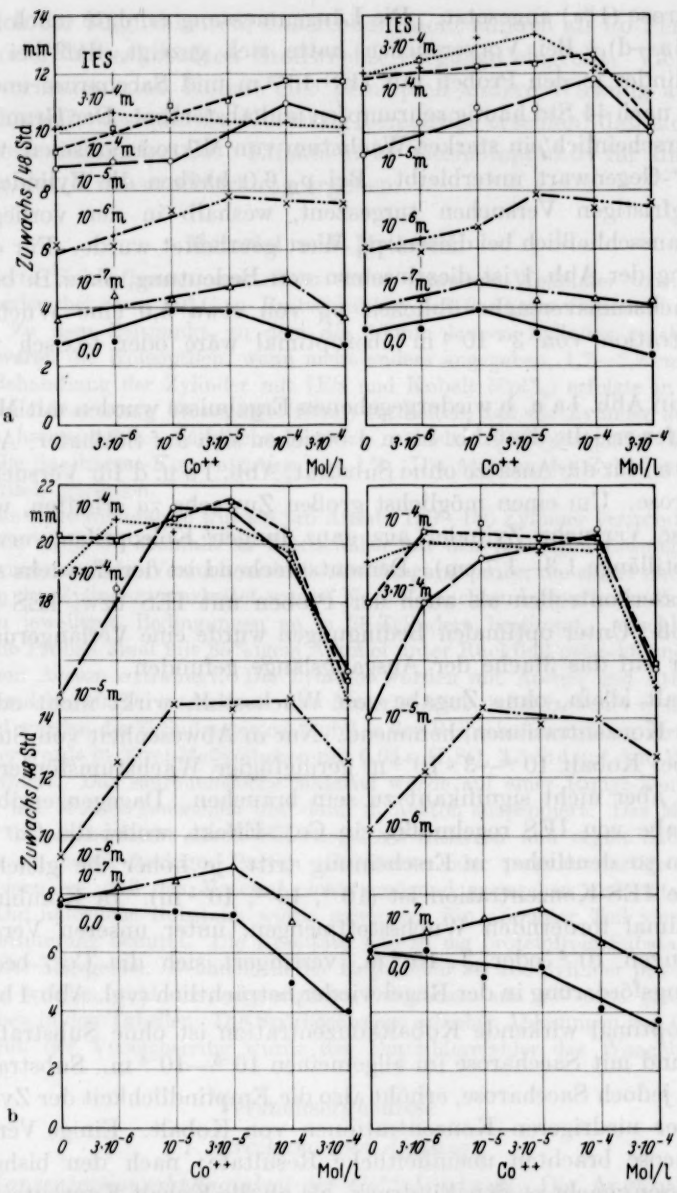


Abb. 1a—d. Zuwachs nach 48 Std in Abhängigkeit von der Co^{++}-Konzentration. a und b: Mauerer Weißhafer. c und d: Stålhafer. a und c: ohne Saccharose. b und d: mit 1% Saccharose. Die einzelnen Kurven entsprechen den jeweiligen IES-Konzentrationen. pH 6,0. Mittelwerte aus 2 Versuchen. Länge der verwendeten Koleoptilen 1,3—1,7 cm

Bestenfalls kommt der höheren Empfindlichkeit des Mauerer Weißhafers gegenüber Kobalt 10^{-4} m in Kombination mit IES 10^{-5}—$3 \cdot 10^{-4}$ m (Abb. 1b u. d) eine gewisse Bedeutung zu. Wie nämlich Atmungsmessungen ergaben, reagiert auch

die Atmung des Mauerer Weißhafers empfindlicher auf Kobalt (Tabelle 1). THIMANN (1956) arbeitete mit 3 mg IES/l (etwa $2 \cdot 10^{-5}$ m). Seine Kobalt-Konzentrationskurve läßt sich sehr gut in die Kurven von Abb. 1b u. d einordnen.

Für die Atmungsmessungen wurden die Zylinder wie bei den Wachstumsversuchen in Petrischalen in die verschiedenen Lösungen eingesetzt. Nach etwa 21 Std und anschließend nach 43 Std wurden sie in mit frischen Lösungen vorbereitete Warburggefäße übertragen. Die Messung des O_2-Verbrauches dauerte jeweils 4 Std, so daß die Mittelwerte in Tabelle 2 etwa für die 22.—24. Std bzw. 44.—48. Std gelten. Die Warburggefäße waren rechteckige Kästchen ohne Mitteleinsatz; es war daher möglich, die Zylinder nach der Atmungsmessung, ohne sie zu beschädigen,

Tabelle 1. *O_2-Verbrauch in Abhängigkeit von der Co^{++}-Konzentration nach 24 Std (22.—26. Std) bzw. 46 Std (44.—48. Std). IES 10^{-5} m, pH 6,0. Länge der verwendeten Koleoptilen 1,5—2,2 cm. Werte in % des O_2-Verbrauches der kobaltfreien Kontrollen. Mittelwerte aus 3 Versuchen. n = 9*

	Std	0,0	$3 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$3 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	$3 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$3 \cdot 10^{-3}$
Mauerer Weißhafer	24	100,0	91,3	91,8	92,0	89,4	85,6	77,8	—
	46	100,0	93,8	89,0	81,2	75,8	71,5	58,2	—
Stålhafer .	24	100,0	—	99,8	98,1	95,2	91,4	81,8	62,0
	46	100,0	—	91,0	87,2	88,6	90,0	74,0	58,0

wieder herauszunehmen und in die Petrischalen zu übertragen. Die Versuche wurden ausschließlich ohne Substrat durchgeführt, weil in Gegenwart von Zucker nach 24 Std bei den Co^{++}-freien Kontrollen leicht ein gewisses Bakterienwachstum einsetzt.

Tabelle 1 zeigt, daß Kobalt im gesamten wachstumsfördernden Konzentrationsbereich die Atmung der Zylinder hemmt. Die Hemmung wird mit zunehmender Dauer der Kobalteinwirkung stärker. Bei der ohne Substrat optimal wachstumsfördernden Konzentration 10^{-4} m beträgt sie je nach Hafersorte nach 24 Std 5–10% und nach 46 Std 12–25%. Wie schon erwähnt, reagiert der Mauerer Weißhafer (Tabelle 1, 1. und 2. Zeile) empfindlicher auf Kobalt. Es war natürlich zu prüfen, ob Kobalt nicht in den ersten Stunden des Versuchs, in denen die Wachstumsrate am höchsten ist (THIMANN u. SCHNEIDER 1938; BENNET-CLARK u. KEFFORD 1954; BONNER u. FORSTER 1955 u.a.), den O_2-Verbrauch doch fördert, und ob nicht die Hemmung erst nach einiger Zeit in Erscheinung tritt.

Aus Tabelle 2 läßt sich jedoch ersehen, daß dies nicht zutrifft. Beim Vergleich jeweils zueinandergehöriger Werte für den O_2-Verbrauch mit und ohne Kobalt ergibt sich, daß Kobalt bereits nach 4 Std die Atmung hemmt. Dies gilt sowohl für die Ansätze mit als auch ohne Substrat. Die sehr geringfügigen Differenzen in der 4.—6. Std sind bei einer Standard-

Tabelle 2. *O_2-Verbrauch bei Gegenwart von IES 10^{-5} m und Co^{++} 10^{-4} m in Abhängigkeit von der Zeit.* pH *6,0. Länge der verwendeten Koleoptilen 1,5—2,2 cm. Mauerer Weißhafer. Werte in µl O_2/Std*

Substrat	Zusätze	n	4.—6. Std	n	12.—14. Std	n	19.—21. Std
			O_2-Verbrauch µl/Std				
Ohne Substrat	Co^{++}	12	65,7	6	49,3	6	42,9
	IES + Co^{++}	12	82,0	6	63,6	6	47,4
	H_2O	10	69,0	6	61,2	6	53,2
	IES + H_2O	12	85,3	6	74,4	6	59,7
Saccharose 1%	Co^{++}	4	89,0	4	71,1	6	61,4
	IES + Co^{++}	11	100,6	6	86,4	6	76,0
	H_2O	4	91,7	4	86,3	6	85,4
	IES + H_2O	11	104,0	6	100,5	6	97,2
			IES-bedingte Förderung µl/Std				
Ohne Substrat	Co^{++}	—	16,3	—	14,3	—	5,5
	H_2O	—	16,3	—	13,2	—	6,5
Saccharose 1%	Co^{++}	—	11,6	—	15,3	—	14,6
	H_2O	—	12,3	—	14,2	—	11,8

abweichung von 1,5—2,5 µl O_2/Std trotz der teilweise recht großen Anzahl von Parallelen statistisch nicht zu sichern. Sie wurden aber regelmäßig auch bei einer größeren, nicht veröffentlichten Serie von Versuchen mit Glucose und Fructose als Substrat gefunden. Dafür sind die Co^{++}-bedingten Differenzen während der 12.—14. Std um so besser gesichert (Tabelle 3). Die Tatsache, daß nach 12—14 Std der O_2-Ver-

Tabelle 3. *Statistische Sicherung der Co^{++}-bedingten Atmungshemmung während der 12.—14. Std. Ohne Saccharose. Werte in µl O_2/Std. Sonstige Angaben wie in Tabelle 2*

	n	− Co^{++}	n	+ Co^{++}	D	σ_D	P
− IES	6	61,2 ± 1,79	6	49,3 ± 1,07	− 11,9	2,08	0,01
+ IES	6	74,4 ± 2,15	6	63,6 ± 1,83	− 10,8	2,82	0,01

brauch in Gegenwart von IES und Kobalt ebensogroß ist wie derjenige in Puffer allein (Zeile 2 u. 3 bzw. 6 u. 7) veranschaulicht die atmungshemmende Wirkung wachstumsfördernder Konzentrationen von Kobalt.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Versuche nur noch mit Kobalt-Konzentrationen von 10^{-4} m und IES-Konzentrationen 10^{-5} m durchgeführt. Außerdem wurde vorwiegend der etwas weniger empfindlichere Stålhafer verwendet. Kobalt 10^{-4} m wirkt bei ihm auch in Gegenwart von Substrat noch optimal wachstumsfördernd (Abb. 1d). Gleichzeitig gehört diese Konzentration noch zu denjenigen, die die Atmung relativ schwach hemmen (Tabelle 1, 3. Zeile); somit war zu

erwarten, daß Co^{++} 10^{-4} m maximale, stoffwechselphysiologische Wirkungen hervorbringt, ohne dabei schon toxisch zu sein. Höhere Wuchsstoffkonzentrationen hätten zwar einen etwas größeren Zuwachs bewirkt, doch wäre dabei der Kobalt-Effekt erniedrigt worden.

b) Zeitabhängigkeit der Co^{++}-Wirkung. Unter optimalen IES-Konzentrationen zeigen die Koleoptilzylinder in den ersten Stunden des Versuchs maximale Zuwachsraten. Mit fortschreitender Zeit nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit mehr oder weniger rasch ab und die Zuwachskurve verläuft dann nach einer gewissen Zeit, wenn der Hauptanteil des unter den jeweiligen Bedingungen möglichen Zuwachses erreicht ist, nahezu parallel zur Ordinate (Thimann u. Schneider 1938; Bennet-Clark u. Kefford 1954 u. a., Abb. 2). Über die Zeitspanne, während der die anfänglichen, maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten beibehalten werden, gehen die Ansichten etwas auseinander (Bennet-Clark u. Kefford 1954; Bonner u. Forster 1955; vgl. auch Busse 1954).

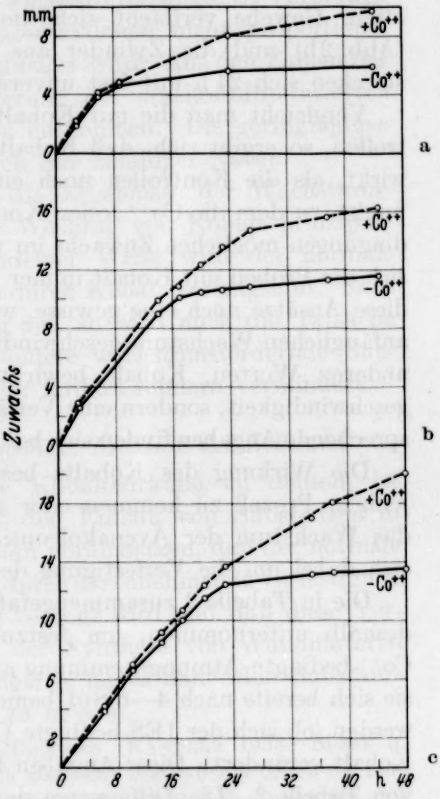


Abb. 2a—c. Zuwachs in Abhängigkeit von der Zeit. IES 10^{-5} m, Co^{++} 10^{-4} m, Saccharose 1 %, p_H 6,0. a Länge der verwendeten Koleoptilen 2,0—2,7 cm. b Länge der verwendeten Koleoptilen 1,7—2,2 cm. c Länge der verwendeten Koleoptilen 1,3—1,7 cm. Typische Einzelversuche

In Abb. 2a—c ist der zeitliche Verlauf der Streckung in Gegenwart von 10^{-5} m IES und 1 % Saccharose mit und ohne 10^{-4} m Kobalt dargestellt. Abb. 2a bezieht sich auf Zylinder, die aus Koleoptilen mit einer Länge von 2,0—2,7 cm geschnitten wurden. Abb. 2b bezieht sich auf solche aus Koleoptilen von einer Länge von 1,7—2,2 cm, und Abb. 2c gilt für Zylinder aus 1,3—1,7 cm langen Koleoptilen. Der Zuwachs der Co^{++}-freien Kontrollen beträgt dementsprechend 6, 12 u. 13,5 mm/48 h.

Betrachtet man den Zuwachs der Proben ohne Kobalt nach 6 h, so zeigt sich, daß dieser in allen 3 Fällen (Abb. 2) unabhängig vom Alter des Gewebes etwa 4 mm beträgt. Die anfängliche Wachstumsgeschwindigkeit ist also jedesmal dieselbe. Wenn aber die Zylinder aus älterem

Gewebe nach 48 h nur rund den halben Zuwachs erreichen wie diejenigen aus jüngerem Gewebe, so kommt dieser Unterschied dadurch zustande, daß die Wachstumsgeschwindigkeit in Abb. 2a nach der 6. h rapide absinkt, und daß die Zuwachskurve sich hier schon nach 10—12 h der Horizontalen asymptotisch nähert. Bei den Zylindern aus mittelaltem Gewebe verflacht sich die Zuwachskurve erst nach 17—20 h (Abb. 2b) und die Zylinder aus ganz jungen Koleoptilen (Abb. 2c) strecken sich 24 h mit fast unveränderter Geschwindigkeit.

Vergleicht man die mit Kobalt behandelten Proben mit den Kontrollen, so ergibt sich, daß Kobalt solange nicht oder nur unerheblich wirkt, als die Kontrollen noch einigermaßen wachsen. Zu dem Zeitpunkt, zu dem die Co^{++}-freien Kontrollen den unter den jeweiligen Bedingungen möglichen Zuwachs im wesentlichen erreicht haben, strecken sich die Proben mit Kobalt immer noch weiter. Selbst nach 48 h zeigen diese Ansätze noch eine gewisse, wenn auch natürlich im Vergleich zur anfänglichen Wachstumsgeschwindigkeit verminderte Zuwachsrate. Mit anderen Worten, Kobalt bewirkt keine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit, sondern eine Verlängerung der Wachstumsdauer. Entsprechende Angaben finden sich bei MILLER (1954) für Erbseninternodien.

Die Wirkung des Kobalts besteht also offensichtlich darin, denjenigen Prozeß zu hemmen oder zu verlangsamen, der normalerweise das Wachstum der Avenakoleoptile beendet. Mutmaßlich handelt es sich dabei um die Verfestigung der Zellwand.

Die in Tabelle 2 zusammengefaßten Versuche wurden hauptsächlich deshalb unternommen, um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt die Co^{++}-bedingte Atmungshemmung auftritt. Wie schon erwähnt, macht sie sich bereits nach 4—6 Std bemerkbar. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, ob sich der IES-bedingte O_2-Verbrauch unter dem Einfluß von Kobalt verändert. Diese Angaben finden sich in den 4 untersten Zeilen von Tabelle 2. Die Differenzen der Atmungsgeschwindigkeit sind hier in μl O_2/Std angegeben.

Wie Tabelle 2 zeigt, weichen die Beträge der IES-bedingten Förderung mit Kobalt (9. u. 11. Zeile) von denen ohne Kobalt (10. u. 12. Zeile) nicht wesentlich ab. Der Unterschied beträgt maximal 3 μl O_2/Std, eine Differenz, die nur mit einer sehr großen Anzahl von Versuchen gesichert werden könnte. Anders liegen die Verhältnisse natürlich, wenn man die IES-bedingte Atmungsförderung in Prozenten der jeweiligen Wasser- bzw. Kobalt-Kontrolle ausdrücken wollte. Durch die kobaltbedingte Atmungshemmung erniedrigt sich der Wert der Bezugsgröße für den IES-Effekt in Gegenwart von Kobalt und führt dadurch zu einer Erhöhung der Prozentangaben.

Wenn in Gegenwart von Kobalt der IES-bedingte O_2-Verbrauch unverändert bleibt, gleichzeitig aber der sonstige Energieumsatz um

5—10% reduziert wird, so bedeutet dies nur, daß in Gegenwart von wachstumsfördernden Konzentrationen von Kobalt die allgemeine Co^{++}-bedingte Hemmung der Atmung noch nicht so groß ist, daß die Zellen nicht mehr in der Lage wären, den IES-induzierten Energiebedarf zu decken. Wichtig ist jedenfalls, daß der wuchsstoffbedingte O_2-Verbrauch unter wachstumsfördernden Co^{++}-Konzentrationen nicht proportional zur Hemmung des Gesamtumsatzes reduziert wird. Aus den Zahlen der Tabelle 2 ist eher eine leichte Steigerung der wuchsstoffinduzierten Atmung in Gegenwart von Kobalt zu entnehmen. Die geringfügigen Abweichungen sind aber wahrscheinlich nur zufälliger Natur.

Zusammenfassend läßt sich über die Ergebnisse der Wachstums- und Atmungsversuche sagen, daß die Wirkung von Kobalt prinzipiell in einer Hemmung besteht. In irgendeiner Weise wird der normale Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit durch Kobalt verlangsamt. Faßt man die Kobaltwirkung als Hemmung auf, so wird auch die Tatsache verständlich, daß Kobalt nicht wie andere wachstumsfördernde Substanzen den O_2-Verbrauch der Zylinder fördert sondern vermindert.

2. Substanzeinbau in die säureunlösliche Fraktion der Zellwand

Eine verlockende Möglichkeit die Kobaltwirkung zu deuten, ist zweifellos die Annahme, daß Kobalt den Einbau von Substanzen in die Zellwand hemmt. Dabei müßte man voraussetzen, daß der normale Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit durch die zunehmende Verfestigung der Zellwand während der Streckung bedingt wird und daß diese Verfestigung der Wand wesentlich von der Synthese von Wandmaterial abhängt. Auf Grund dieser Gedankengänge lag es nahe, den Substanzeinbau in die Zellwand unmittelbar zu messen.

Zunächst wurde versucht, Kohlenstoffbilanzen (Kandler 1953; Busse u. Kandler 1956) aufzustellen. Es ergab sich aber, daß die Zylinder durch die notwendige Vorbehandlungszeit von mindestens 10 Std (vgl. Abb. 2) bereits mit Mikroorganismen infiziert sind. Diese vermehren sich in den Zuckerlösungen rasch und verfälschen die Kohlenstoffbilanz. Da für die Beurteilung der Co^{++}-Wirkung nur gleichzeitig aufgestellte Bilanzen herangezogen werden können, blieben von einer größeren Versuchsserie nur wenige brauchbare Einzelversuche übrig, deren Ergebnisse aber auch nicht sehr gut miteinander übereinstimmten.

Es war sowieso unsicher, ob der Gesamteinbau die vermutete Einbauhemmung in die Zellwand widerspiegelt. Immerhin wäre es denkbar, daß in Gegenwart von Kobalt vorwiegend der Einbau in die Wand gehemmt wird, daß aber der Einbau in die Reservesubstanzen unvermindert weiterläuft. Umgekehrt hätte auch eine bedeutende Hemmung des Gesamteinbaus nicht bewiesen, daß die Wandsubstanzen anteilmäßig betroffen sind. Daher wurde versucht, die Zellwandsubstanzen zu extrahieren und ihre Zunahme während des Wachstums zu wiegen.

Die alkoholunlöslichen Bestandteile von 100 frisch geschnittenen Zylindern wiegen etwa 30—35 mg. Davon sind 12—15 mg Protein. Analysiert man jeweils eine Ausgangsprobe und noch 3 Behandlungen,

so braucht man bereits 400 Zylinder. Für die Trennung in die hauptsächlichsten Wandsubstanzen Pektin, Hemicellulosen und Cellulose reichen aber 20 mg, vor allem wenn man auf Wägungen angewiesen ist, nicht aus. Bereits eine Verdoppelung der pro Ansatz verwendeten Zylinder bedingt einen Arbeitsaufwand, den ein einzelner in Serienversuchen nur mit Mühe bewältigen könnte. Es war daher notwendig, die Analyse auf eine bestimmte Zellfraktion zu beschränken.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der in 0,05 n Säure unlösliche Anteil der Zellwand untersucht. Diese Fraktion enthält einen Großteil der Hemicellulosen und der α-Cellulose (BISHOP u. Mitarb. 1958). Es war anzunehmen, daß gerade sie für die Verfestigung der Zellwand von besonderer Bedeutung sein würden. Diese Fraktion macht allerdings nur 50—60% der gesamten Zellwandsubstanz aus.

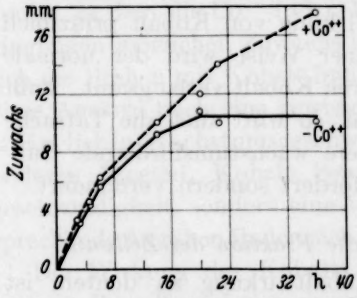


Abb. 3. Zuwachs in Abhängigkeit von der Zeit. Alle Angaben wie in Tabelle 4

Bei diesen Versuchen wurden die Zylinder wiederum in Petrischalen mit IES 10^{-5} m und Co^{++} 10^{-4} m in Gegenwart von Saccharose verschieden lang behandelt. Im Unterschied zu den bisherigen Versuchen wurden sie während dieser Zeit auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Anschließend wurden die Längen von je 20 Zylindern pro Ansatz gemessen. Die Zylinder wurden dann mit heißem 85%igen Alkohol und Aceton extrahiert. Bei 105° C getrocknet blieben die Zylinder fast rein weiß. Sie wurden gewogen, zerrieben und mit 50 ml 0,05 n H_2SO_4 auf dem Wasserbad extrahiert und der Rückstand in Filtertiegeln abfiltriert und gewogen (Einzelheiten s. Methodik).

In Abb. 3 ist aus einigen Versuchen der zeitliche Verlauf des Wachstums der hier verwendeten Zylinder zusammengestellt. Es handelt sich also nicht um Messungen an ein und denselben Zylindern, sondern jedes Punktepaar stammt aus einem Versuch. Der Kurvenverlauf entspricht ungefähr demjenigen von Abb. 2b, doch zeigt sich, daß das Schütteln einen gewissen Einfluß auf das Wachstum ausübt. Während die nichtgeschüttelten Zylinder (Abb. 2a—c) nach 6 Std einen Zuwachs von 4 mm aufwiesen, ergibt sich hier ein Zuwachs von 6 mm. Noch deutlicher wird der Einfluß des Schüttelns, wenn man den Einbau in die säureunlösliche Fraktion der Zellwand betrachtet. Bei dem nichtgeschüttelten Versuch 54 (Tabelle 4) beträgt der Substanzeinbau nur etwa $^1/_3$ desjenigen bei den vergleichbaren, geschüttelten Ansätzen (Tabelle 1, 64, 67, 58). Bisher galt es allgemein als nicht notwendig, bei Wachstumsversuchen zu schütteln, sofern die Zylinder die Oberfläche

des Mediums durchbrechen. Soweit es die O_2-Versorgung angeht, mag dies richtig sein. Die Substratversorgung wird aber nur durch Schütteln gewährleistet.

Tabelle 4 gibt die Versuche über den Einbau von Substrat in die säureunlösliche Fraktion der Zellwand wieder. Aus Spalte 4 ist die Menge säureunlöslicher, proteinfreier Wandsubstanz pro 100 Zylinder zu ersehen. Aus Spalte 5 ergibt sich der während des Versuchs stattgefundene Einbau in diese Fraktion. Spalte 6 zeigt die Wirkung des Kobalts auf die Streckung, ausgedrückt in Prozenten der Endlänge der Co^{++}-freien Kontrolle. Die Einzelversuche der Tabelle 4 sind von unten nach oben nach zunehmender Co^{++}-bedingter Wachstumsförderung (Spalte 6) geordnet, was ungefähr einer Anordnung nach der Versuchsdauer entspricht. Bezüglich Versuch 54 siehe oben. Bei den Versuchen 54, 62 und 60_1 ergibt sich die behauptete, kobaltbedingte Einbauhemmung unmittelbar aus Spalte 5. Bei den kurzfristigen Versuchen ist sie nicht nachzuweisen, was aber bei dem geringfügigen Gesamteinbau daran liegen dürfte, daß die selbstverständlich recht kleinen Differenzen zwischen den Ansätzen mit und ohne Kobalt aus rein methodischen Gründen nicht zu erfassen waren. Bei den langfristigen Versuchen ($67, 58, 60_2$) findet sich dagegen bei den Proben mit Kobalt mehr säureunlösliche Substanz als bei den Kontrollen.

Diese Vermehrung der Wandsubstanz bei langfristigen Versuchen kann nur eine Folge der größeren Streckung sein. Es muß angenommen werden, daß die Einbaugeschwindigkeit entscheidend davon abhängt, wie groß die Fläche ist, auf der Substanz auf- bzw. eingelagert werden soll. Die Dehnung der Zellwand ermöglicht also eine vermehrte Intussusception. Ein Hinweis dafür, daß der Substanzeinbau durch die Streckung bzw. Wandflächenvergrößerung gefördert wird, ergibt sich aus Tabelle 5. In ihr ist der Einbau in die säureunlösliche Fraktion mit und ohne IES dargestellt. Dieser Einbau ist in Gegenwart von Wuchsstoff um mindestens 30% erhöht.

In Tabelle 4, Spalte 7, ist die Wandsubstanzmenge pro Längeneinheit berechnet. In Spalte 8 sind die Werte in Prozenten der jeweiligen Ausgangsprobe angegeben. Der Quotient wurde als „Wanddicke" bezeichnet, wobei man sich im klaren sein muß, daß der Berechnung nicht die gesamte Wandsubstanz, sondern nur der schwerlösliche Anteil zugrunde liegt.

Die „Wanddicke" ist in Gegenwart von Kobalt durchgehend geringer als bei den kobaltfreien Kontrollen. Die Differenzen zwischen den beiden Behandlungen vergrößern sich mit zunehmender Länge. Weiter fällt auf, daß die Werte etwa bei Versuch 60 ein Minimum durchlaufen. Versuch 54 kann dabei nicht gewertet werden, da er aus den angegebenen Gründen gerade in diesem Zusammenhang von den übrigen stark abweicht.

Tabelle 4. *Substanzeinbau in die säureunlösliche Fraktion der Zellwand. IES 10^{-5} m, Co^{++} 10^{-4} m, Saccharose 1%, p_H 6,0. Länge der verwendeten Koleoptilen 1,5—2,2 cm. Stålhafer*

1		2	3	4	5	6	7	8
Versuchs-				Säure-unlösliche Wand-substanz pro 100 Zylinder	Einbau in die säure-unlösliche Fraktion	Co^{++}-bedingte Längen-zunahme in % der Kontrollen	„Wanddicke"	
Nr.	Dauer Std	Behandlung	Länge mm	mg	mg		mg Säure-unlösliches je mm	in % der Ausgangs-probe
60_2	36,0	Ausgangsprobe	10,00	11,79	—		1,18	100,0
		− Co	20,10	23,18	11,39		1,15	97,4
		+ Co	27,47	25,19	14,40	136,6	0,92	78,0
58	22,5	Ausgangsprobe	10,00	9,38	—		0,94	100,0
		− Co	21,07	15,27	5,89		0,73	77,6
		+ Co	25,37	15,95	6,57	120,5	0,63	67,0
67	22,5	Ausgangsprobe	10,00	8,89	—		0,89	100,0
		− Co	20,00	14,79	5,90		0,74	83,3
		+ Co	24,00	15,72	6,83	120,0	0,65	73,0
64	20,0	Ausgangsprobe	10,00	9,46	—		0,95	100,0
		− Co	20,82	14,51	5,05		0,70	73,7
		+ Co	22,00	14,79	5,33	108,5	0,67	70,6
60_1	11,5	Ausgangsprobe	10,00	11,79	—		1,18	100,0
		− Co	17,72	15,82	4,04		0,89	75,4
		+ Co	19,15	14,92	3,13	108,0	0,78	66,2
62	14,0	Ausgangsprobe	10,00	11,60	—		1,16	100,0
		− Co	19,22	15,15	3,55		0,79	69,0
		+ Co	20,07	13,75	2,15	104,6	0,69	59,4
54*	22,5	Ausgangsprobe	10,00	9,78	—		0,96	100,0
		− Co	21,35	11,87	2,09		0,56	58,4
		+ Co	22,07	10,11	1,33	103,0	0,46	47,9
74	6,0	Ausgangsprobe	10,00	9,00	—		0,90	100,0
		− Co	15,68	10,63	1,63		0,67	74,5
		+ Co	16,27	10,60	1,60	104,0	0,65	72,2
68	5,5	Ausgangsprobe	10,00	9,41	—		0,94	100,0
		− Co	14,67	10,82	1,42		0,74	78,7
		+ Co	15,15	11,06	1,65	103,3	0,73	77,7
73	4,5	Ausgangsprobe	10,00	8,78	—		0,88	100,0
		− Co	14,45	10,32	1,54		0,71	80,7
		+ Co	14,55	10,16	1,38	100,6	0,70	79,4
72	3,0	Ausgangsprobe	10,00	9,12	—		0,91	100,0
		− Co	13,27	9,82	0,70		0,74	81,3
		+ Co	13,35	9,60	0,48	100,5	0,72	79,7

* Zylinder wurden während der Behandlung nicht geschüttelt.

In Abb. 4 sind die Werte für die „Wanddicke" (Tabelle 4, Spalte 8) gegen die jeweiligen Längen aufgetragen. Man erkennt, daß die Substanzmenge pro mm auch bei den kobaltfreien Kontrollen während der Streckung keineswegs konstant bleiben. Ausgehend von dem Wert

der Ausgangsprobe (100%) sinkt sie während einer Verlängerung um 3 mm auf 80% ab und fällt dann stetig. Solange die kobaltbedingte Wachstumsförderung noch nicht einsetzt, sind die beiden Behandlungen mit und ohne Kobalt nicht zu unterscheiden. Bei einer Länge von etwa 17 mm beginnen sich dann die beiden Kurven zu trennen. Infolge der abnehmenden Zuwachsrate ist die Geschwindigkeit des Einbaus bei den kobaltfreien Kontrollen jetzt größer als die Geschwindigkeit der Flächenzunahme. Die Wand wird wieder verstärkt. Die „Wanddicke" der mit Kobalt behandelten Proben sinkt jedoch noch weiter.

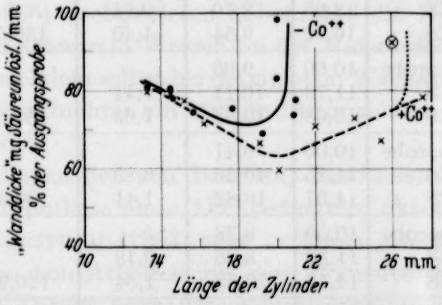


Abb. 4. „Wanddicke" (mg säureunlösliche Wandsubstanz je mm) in Abhängigkeit von der Länge der Zylinder. Alle Angaben wie in Tabelle 4. ●—● $-Co^{++}$, ×– – –× $+Co^{++}$, ⊗ Wert nicht aus Tabelle 4 (vgl. Text)

Dies ist einerseits auf die Einbauhemmung, andererseits auf den langsameren Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit zurückzuführen. Der Umkehrpunkt der Kurve liegt bei niedrigeren Werten für die „Wanddicke", und außerdem erfolgt der Wiederanstieg langsamer als bei den Kontrollen. Daß die Kurve für Kobalt ebenso wie bei den Kontrollen gegen Ende der Streckung wieder steil ansteigt, hätte sich aus den Zahlen der Tabelle 4 nicht nachweisen lassen. Abb. 4 wurde daher noch durch einen Punkt aus einem sehr langfristigen Versuch (48 Std) ergänzt, bei dem keine kobaltfreien Kontrollen mitgeführt wurden. Der sich daraus ergebende ungefähre Kurvenverlauf wurde punktiert in Abb. 4 eingezeichnet.

Faßt man die Ergebnisse dieses Abschnittes zusammen, dann erhält man folgendes Bild. Bei hoher Streckungsgeschwindigkeit wird die Wand, zumindest soweit es die säureunlöslichen Anteile betrifft, ständig dünner. Die Geschwindigkeit des Substanz-Einbaus wird zwar bei erhöhter Streckung gefördert (Tabelle 5), mutmaßlich als Folge der Oberflächenvergrößerung, jedoch vermag sie der Oberflächenvergrößerung nicht Schritt zu halten. Kobalt hemmt den Einbau von Wandmaterial. Dieser Effekt ist, solange die kobaltbedingte Wachstumsförderung noch nicht in Erscheinung tritt, ohne weiteres meßbar. In

Tabelle 5. *Substanzeinbau in die säureunlösliche Fraktion der Zellwand. IES 10^{-5} m, Saccharose 1%, pH 6.0. Länge der verwendeten Koleoptilen 1,5—2,2 cm. Stálhafer*

1		2	3	4	5	6	7	8
Versuchs-							„Wanddicke"	
Nr.	Dauer Std	Behandlung	Länge mm	Säure-unlösliche Wand-substanz mg	Einbau in die säure-unlösliche Fraktion mg	IES-bedingte Längen-zunahme in % der Kontrollen	mg Säure unlös-liches je mm	in % der Aus-gangs-probe
69	10,5	Ausgangsprobe	10,00	8,14	—		0,81	100,0
		− IES	12,05	8,70	0,54		0,72	89,9
		+ IES	16,82	9,54	1,40	139,5	0,57	70,2
74	6,0	Ausgangsprobe	10,00	9,00	—		0,90	100,0
		− IES	11,73	10,11	1,11		0,86	94,7
		+ IES	15,68	10,63	1,63	133,6	0,67	74,5
68	5,5	Ausgangsprobe	10,00	9,41	—		0,94	100,0
		− IES	11,25	10,20	0,89		0,91	96,8
		+ IES	14,67	10,82	1,41	130,3	0,74	78,7
73	4,5	Ausgangsprobe	10,00	8,78	—		0,88	100,0
		− IES	11,30	8,96	0,18		0,79	89,9
		+ IES	14,45	10,32	1,54	126,9	0,71	80,7
72	3,0	Ausgangsprobe	10,00	9,12	—		0,91	100,0
		− IES	11,30	9,74	0,62		0,86	94,5
		+ IES	13,27	9,82	0,70	116,4	0,74	81,3

späteren Stadien der Streckung wird die kobaltbedingte Einbauhemmung durch den fördernden Einfluß der größeren Wandfläche kompensiert. Sobald die Streckung der Zylinder im wesentlichen beendet ist, nimmt die Wandsubstanz pro Längeneinheit wieder stark zu.

Diskussion der Ergebnisse

Die unerwartete Tatsache, daß die Wachstumsförderung durch Kobalt nicht wie z. B. die IES-bedingte Förderung zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Versuchsbeginn (BUSSE u. KANDLER 1956; KÖHLER 1956) auftritt, sondern je nach Alter der Zylinder stets dann, wenn die Wachstumsgeschwindigkeit der Wuchsstoffkontrollen langsam gegen Null geht (Abb. 2), zwingt zu dem Schluß, daß Kobalt das normale Ende der IES-bedingten Streckung verhindert bzw. hinauszögert. Die Wachstumsförderung durch Kobalt ist also als Hemmung zu verstehen. Infolgedessen kann es auch nicht verwundern, wenn Kobalt gleichzeitig den Gesamt-O_2-Verbrauch der Koleoptilzylinder reduziert. Wachstumsfördernd wären demnach solche Konzentrationen von Kobalt, die den Energie- und Stoffwechsel der Zellen nicht so sehr hemmen, daß diese nicht mehr in der Lage sind, den zweifellos endergonen Streckungsprozeß durchzuführen (FRENCH u. BEEVERS 1953; BUSSE u. KANDLER

1956). Die IES-bedingte Atmungssteigerung ist daher in Gegenwart von Kobalt nicht wesentlich verändert (Tabelle 2).

Kobalt muß also hemmend auf einen Vorgang einwirken, der den normalen Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit verursacht. Dabei müssen folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen werden.

Als Wuchsstoffwirkung wurde verschiedentlich eine Permeabilitätserniedrigung angenommen (Pohl 1953). Es wäre daher denkbar, daß das Ende der Streckung durch eine Erniedrigung der Wasserpermeabilität des Plasmas bedingt wird und daß Kobalt diese Permeabilitätserniedrigung verzögert. Nachdem aber Ketellapper (1953) und Ordin u. Bonner (1956) nachgewiesen haben, daß die Halbwertszeit für den Austausch von schwerem Wasser bei der Haferkoleoptile nur 8—10 min beträgt, und nachdem selbst bei maximalem Wachstum die Verlängerung bzw. die Wasseraufnahme nur 10%/Std ausmacht, muß diese Möglichkeit wohl ausscheiden.

Die Grundlagen der von Bonner, Bandurski u. Millerd (1953) vertretenen Hypothese einer IES-bedingten, aktiven Wasseraufnahme sind durch Burström (1953) sehr in Frage gestellt. Außerdem kann das Erscheinen von Arbeiten aus dem Bonnerschen Institut, in denen die Rolle des Turgor beim Streckungswachstum wiederentdeckt wird (Bonner, Ordin u. Cleland 1955; Ordin, Applewhite u. Bonner 1956), als Widerruf der 1953 geäußerten Ansichten gelten. Ein Co^{++}-Einfluß auf eine IES-bedingte, aktive Wasseraufnahme braucht daher nicht berücksichtigt zu werden.

Das Ende der Streckung könnte auch durch eine zunehmende Verfestigung der Zellwand herbeigeführt werden. Die Wirkung des Kobalts bestünde dann darin, daß es den Einbau von Substanz in die Wand hemmt und dadurch die Verfestigung der Zellwand verlangsamt. Eine solche Einbauhemmung konnte nun zumindest für den Zeitpunkt, zu dem die Co^{++}-bedingte Längenförderung einsetzt, nachgewiesen werden (Tabelle 4).

Für die späteren Stunden des Versuchs ist der exakte Nachweis der Hemmung vorläufig mangels geeigneter Kontrollen nicht möglich. Nachdem die Streckungsgeschwindigkeit offensichtlich einen Einfluß auf die Einbaurate hat (Tabelle 5), kann genaugenommen nur der Einbau gleich langer Zylinder miteinander verglichen werden. Für die späteren Stunden des Versuchs ist dies aber, eben wegen der Co^{++}-bedingten Streckungsförderung, schlecht möglich. Nachdem sich die Befunde über die zeitliche Abhängigkeit der Co^{++}-bedingten Wachstumsförderung vom Alter der Zylinder, über die Atmungs- und Einbauhemmung so sinnvoll ineinanderfügen, dürfte die Unsicherheit bei den langfristigen Versuchen kein hinreichender Anlaß sein, an der behaupteten Wirkung des Kobalts zu zweifeln.

Wachsen Koleoptilzylinder ohne Substratzufuhr, so kann keine erhebliche Vermehrung der Wandsubstanz stattfinden, weil der Stärkegehalt etiolierter Koleoptilen nur etwa 1% der alkoholunlöslichen Zellbestandteile ausmacht (BISHOP u Mitarb. 1958). Substratzufuhr, die einen bedeutenden Einbau von Wandsubstanz bewirkt (Tabelle 4), erhöht die erreichbare Endlänge der Zylinder (Abb. 1). Dagegen ist in Anwesenheit von Kobalt Einbauhemmung und Zuwachssteigerung gekoppelt. Eine befriedigende Deutung beider Tatbestände findet sich, wenn man annimmt, daß die Streckungsfähigkeit der Wand von dem mengenmäßigen Anteil einer bestimmten Zellwandfraktion abhängt, die für die irreversible Dehnbarkeit der Wand von entscheidender Bedeutung ist. Der Aufbau dieser Fraktion, deren Mikrofibrillen provisorisch als Festigungselemente bezeichnet werden sollen, wäre danach die Ursache für den kontinuierlichen Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit. Bei Substratzufuhr muß entsprechend der ständigen Zunahme der Wandsubstanz auch eine größere Menge dieser Festigungselemente synthetisiert werden, bis sich der Betrag der irreversiblen Dehnbarkeit der Wand soweit erniedrigt hat, daß die Zelle das osmotische Gleichgewicht erreicht. Die Zeitspanne, während der sich die Zylinder verlängern können, ist größer oder, was auf dasselbe herauskommt, der Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit ist verlangsamt. Werden die Zylinder hingegen mit Kobalt behandelt, so sind die Polysaccharidsynthesen gehemmt. Der Aufbau der Festigungselemente ist davon natürlich ebenso betroffen wie etwa der Substanzeinbau in Gegenwart von Substrat. Es ist leicht einzusehen, daß dies ebenfalls den Abfall der Wachstumsrate vermindern muß.

Die Versuche über die Wirkung des Kobalts auf das Streckungswachstum haben zu der Annahme geführt, daß für den Verlauf des Wachstums eine bestimmte Zellwandfraktion von entscheidender Bedeutung ist. Es soll nun untersucht werden, ob auf Grund dieser Vorstellung auch Aussagen über die Wirkung des Wuchsstoffes selbst gemacht werden können.

Soweit bisher bekannt, tritt als erste Auxinwirkung die Erhöhung der Streckungsgeschwindigkeit auf. Nach BONNER u. FORSTER (1955) steigt die Wachstumsgeschwindigkeit nach Zugabe von Wuchsstoff sprunghaft auf ihren Maximalwert an. BUSSE u. KANDLER (1956) und KÖHLER (1956) fanden, daß die Streckungsgeschwindigkeit nach etwa 30 min ihren Maximalwert erreicht. Die Förderung der Atmung durch IES tritt sehr viel langsamer in Erscheinung (BUSSE u. KANDLER 1956). Sonstige Auxinwirkungen wie z.B. Substanzeinbau wurden bisher noch nicht in kurzfristigen Versuchen gemessen. Einen relativ schnell auftretenden Auxineffekt fanden MARRÈ u. FORTI (1958). Sie stellten fest, daß der ATP-Spiegel IES-behandelter Erbseninternodien im Vergleich

zu den Kontrollen rasch ansteigt, wobei das Maximum nach etwa 30 min erreicht wird. Diese Auxinwirkung kann aber kaum mit einer unmittelbar IES-bedingten Atmungsförderung in Zusammenhang stehen, wie diese Autoren annehmen, da aus den Atmungskurven von MARRÈ u. FORTI hervorgeht, daß die IES-induzierte Atmungsförderung erst 30—40 min später einsetzt. Unserer Meinung nach ist anzunehmen, daß die Steigerung des ATP-Spiegels eine Folge des auxin-induzierten Stoffwechsels der Zellwandsubstanzen darstellt.

Nachdem die Verfestigung der Wand den Verlauf des Wachstums, d.h. die jeweilige Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt und gleichzeitig die Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit die früheste Wuchsstoffwirkung ist, muß geschlossen werden, daß der Wuchsstoff primär auf diejenigen Elemente der Wand einwirkt, die die plastische Dehnbarkeit der Zellwand herabsetzen. Auxinfreie Koleoptilzylinder wachsen langsam und befinden sich nahezu im osmotischen Gleichgewicht. Durch Auxinzufuhr werden die Festigungselemente teilweise abgebaut, die plastische Dehnbarkeit der Wand nimmt zu (TAGAWA u. BONNER 1957; CLELAND 1958; für dekapitierte Koleoptilen HEYN 1931), wodurch die Streckung eingeleitet wird. Im Verlauf der Streckung wird diese als Festigungselemente bezeichnete Wandfraktion wieder aufgebaut, ein Vorgang, der sich im Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit spiegelt.

Es ist vorläufig noch nicht zu entscheiden, ob Auxin auch in die Neusynthese der Festigungselemente eingreift. Somit ergibt sich die Möglichkeit, daß die Streckung nicht allein durch Wuchsstoff, sondern von zwei verschiedenen, einander entgegengerichteten Stoffwechselprozessen gesteuert wird. Der eine wäre der auxin-bedingte Auslösemechanismus der Streckung, der mutmaßlich durch Plastizitätserhöhung die Voraussetzungen für die Volumzunahme schafft, der andere würde durch Verfestigung der Wand die Streckung in gewissen, sozusagen biologisch sinnvollen Grenzen halten. Dabei könnte die Geschwindigkeit der Wandverfestigung eine Funktion der jeweiligen Zuwachsrate sein.

Diese Vorstellungen könnten vielleicht eine Arbeitshypothese für verschiedene Probleme abgeben. Hemmstoffe können danach entweder echte Antiauxine sein, die die Wuchsstoffwirkung aufheben, sie können aber ebensogut die Wandverfestigung fördern und dadurch die Streckung einschränken. Umgekehrt können scheinbare Synergisten der Auxine analog zu Kobalt die Wandverfestigung verlangsamen. Experimentell lassen sich solche Fragen durch eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Streckung leicht entscheiden. Möglicherweise wirft die hier vorgetragene Auffassung auch neues Licht auf die Frage des Etiolements. Wenn man annimmt, daß im Dunkeln die Wandverfestigung langsamer vor sich geht als im Licht, so ließe sich verstehen, warum etiolierte Sprosse gegen Wuchsstoff empfindlicher sind, obwohl sie wegen der

fehlenden photolytischen Auxinzerstörung (BRAUNER 1953; BRAUNER u. BRAUNER 1954) einen höheren Auxinspiegel haben sollen als grüne Pflanzen.

Die mit Kobalt erzielten Ergebnisse geben unserer Meinung nach Veranlassung, nach einer Zellwandfraktion zu suchen, die die mechanischen Eigenschaften der Wand bestimmt. Dabei bleibt natürlich offen, ob es sich hier um bestimmte Polysaccharide handelt, die sich mit chemischen Methoden von den übrigen Wandsubstanzen abtrennen lassen. Möglicherweise handelt es sich entsprechend den Vorstellungen von WARDROP (1955) um morphologische Einheiten in der Nähe aktiver Zentren der wachsenden Zellwand.

Zusammenfassung

1. An Koleoptilzylindern von *Avena* wurde die Wirkung von Kobaltionen auf Streckung und Atmung in Abhängigkeit von der Kobaltkonzentration und der Zeit untersucht. Ferner wurde der Einfluß von Kobalt auf den Einbau von Wandsubstanz in die in 0,05 n H_2SO_4 unlösliche Fraktion der Zellwand festgestellt.

2. Es ergab sich, daß die IES-bedingte Streckung der Zylinder durch Kobalt maximal um 40—60% gefördert wird. Der O_2-Verbrauch der Zylinder wird gleichzeitig um 5—10% gehemmt.

3. Die kobaltbedingte Wachstumsförderung tritt erst dann in Erscheinung, wenn die kobaltfreien Kontrollen ihr Wachstum nahezu eingestellt haben. Bei Zylindern aus alten Koleoptilen ist dies früher der Fall als bei solchen aus jungen Zylindern.

4. Zu dem Zeitpunkt, zu dem die kobaltbedingte Wachstumsförderung auftritt, ist der Einbau von Substanz in die säureunlösliche Fraktion der Zellwand gehemmt.

5. Die Kobaltwirkung wird auf Grund dieser Befunde als eine Hemmung derjenigen Prozesse angesehen, die normalerweise das Ende der IES-induzierten Streckung durch einen stetigen Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit herbeiführen. Es wird angenommen, daß dieser Abfall der Streckungsgeschwindigkeit durch eine zunehmende Verfestigung der Wand hervorgerufen wird und daß die kobaltbedingte Hemmung des Substanzeinbaus diese Wandverfestigung verlangsamt.

6. Ein Vergleich der Kobaltwirkung mit der Wirkung von Substrat auf Wachstum und Substanzeinbau führt zu dem Schluß, daß die Wachstumsfähigkeit der Zellen der Koleoptile entscheidend von einer bestimmten Zellwandfraktion abhängt. Die Bedeutung dieser Annahme für das Problem der primären Wuchsstoffwirkung wird diskutiert.

Herrn Prof. Dr. BRAUNER danke ich für sein stetes Interesse an dem Fortgang dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt den Studierenden Frl. D. FUCHS, Herrn A. BRESINSKYI, Herrn A. HAMM und Herrn W. PROPACH, die mich abwechselnd bei der Durchführung der Versuche unterstützten.

Literatur

BENNET-CLARK, T. A., and N. P. KEFFORD: The extension growth-time relationship for Avena coleoptile sections. J. exp. Bot. **5**, 293—304 (1954). — BISHOP, C. T., S. T. BAYLEY and G. SETTERFIELD: Chemical constitution of the primary cell wall of the Avena coleoptiles. Plant Physiol. **33**, 283—289 (1958). — BONNER, J., R. BANDURSKI and A. MILLERD: Linkage of respiration to auxin-induced water uptake. Physiol. Plantarum (Cph.) **6**, 511—522 (1953). — BONNER, J., and R. J. FORSTER: The growth-time relationship of the auxin-induced growth in the Avena coleoptile sections. J. exp. Bot. **6**, 293—302 (1955). — BONNER, W. D., and K. V. THIMANN: Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts. III. The action of some inhibitors concerned with pyruvate metabolism. Amer. J. Bot. **37**, 66—75 (1950). — BRAUNER, L.: Untersuchungen über die Photolyse des Heteroauxins. I. Z. Bot. **41**, 291—341 (1953). — BRAUNER, L., u. M. BRAUNER: Untersuchungen über die Photolyse des Heteroauxins. II. Z. Bot. **42**, 83—124 (1954). — BURSTRÖM, H.: Growth and water absorption of Helianthus tuber tissue. Physiol. Plantarum (Cph.) **6**, 685—691 (1953). — BUSSE, M.: Über den Einfluß des Heteroauxins auf das Streckungswachstum und den Atmungsstoffwechsel der Avenakoleoptile. Diss. Univ. München 1954. — BUSSE, M., u. O. KANDLER: Über die Wirkungen der β-Indolylessigsäure auf den Stoffwechsel von Avenakoleoptilen. Planta (Berl.) **46**, 619—642 (1956). — CLELAND, R.: A separation of auxin-induced cell wall loosening into its plastic and elastic components. Physiol. Plantarum (Cph.) **11**, 599—603 (1958). — COMMONER, B., and K. V. THIMANN: On the relation between growth and respiration in the Avena coleoptile. J. gen. Physiol. **24**, 279—296 (1941). — FRENCH, R. C., and H. BEEVERS: Respiratory and growth responses induced by growth regulators and allied compounds. Amer. J. Bot. **40**, 660—666 (1953). — GLASZIOU, K. T.: The effect of auxins on the binding of pectin methylesterase to cell wall preparations. Aust. J. biol Sci. **1**, 426—434 (1957). — HEYN, A. N. J.: Der Mechanismus der Zellstreckung. Rec. Trav. bot. neerl. **28**, 113—244 (1931). — KANDLER, O.: Über den „Synthetischen Wirkungsgrad" in vitro kultivierter Embryonen, Wurzeln und Sprosse. Z. Naturforsch. 8b, 109—117 (1953). — KETELLAPPER, H. L.: The mechanism of the action of indole-3-acetic acid on the water absorption by Avena coleoptile sections. Acta bot. neerl. **2**, 387—444 (1953). KÖHLER, D.: Über die Beziehung zwischen der Länge von Haferkoleoptilen und der Wachstumsgeschwindigkeit ihrer isolierten Ausschnitte. Planta (Berl.) **47**, 159—164 (1956). — MARRÈ, E., and G. FORTI: Metabolic responses to auxin. III. The effects of auxin on ATP level as related to the auxin induced respiration increase. Physiol. Plantarum (Cph.) **11**, 36—47 (1958). — MILLER, C. O.: Promoting effect of cobaltous and nickelous ions on expansion of etiolated bean leaf disks. Arch. Biochem. **32**, 216—218 (1951). — The influence of cobalt und sugars upon the elongation of etiolated pea stem segments. Plant Physiol. **29**, 79—82 (1954). — OGINSKI, EVELYN L., and HELEN L. RUMBOUGH: A cobalt activated bacterial pyrophosphatase. J. Bact. **70**, 92—98 (1955). — ORDIN, L., T. H. APPLEWHITE and J. BONNER: Auxin induced water uptake by Avena coleoptile sections. Plant Physiol. **31**, 44—53 (1956). — ORDIN, L., and J. BONNER: Permeability of Avena coleoptile sections to water measured by diffusion of deuterium hydroxide. Plant Physiol. **31**, 53—57 (1956). — ORDIN, L. R. CLELAND and J. BONNER: Influence of auxin on cell wall metabolism. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **41**, 1023—1029 (1955). — Methyl esterification of cell wall constituents under the influence of auxin. Plant Physiol. **32**, 216—220 (1957). — POHL, R.: Zur Reaktionsweise des Wuchsstoffes bei der Zellstreckung. Z. Bot. **41**, 343—372 (1953). — RAY, P. M.: Composition of cell walls of Avena coleoptiles. Plant Physiol. **33**, Suppl., 17 (1958). SLOCUM, D. H., and J. E. LITTLE: Growth stimulation of Avena coleoptiles. Plant

Physiol. **32**, 192—196 (1957). — Tagawa, T., and J. Bonner: Mechanical properties of the Avena coleoptile as related to auxin and ionic interactions. Plant Physiol. **32**, 207—212 (1957). — Thimann, K.V.: Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts. V. The effect of cobalt and other metals. Amer. J. Bot. **43**, 241—250 (1956). — Thimann, K.V., and C.L. Schneider: The role of salt, hydrogen ion concentration and sugar in the response of the Avena coleoptile to auxins. Amer. J. Bot. **25**, 270—280 (1938). — Warburg, O.: Schwermetalle als Wirkgruppen von Fermenten. Berlin: Dr. W. Sänger 1946. — Wardrop, A.B.: The mechanism of surface growth in parenchyma of Avena coleoptiles. Austr. J. Bot. **3**, 137—148 (1955). — Wilson, C.M., and F. Skoog: Indoleacetic acid induced changes in the uronide fractions and growth of excised tobacco pith tissue. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 204—211 (1954).

Dr. Martin Busse,
Weihenstephan, Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft,
Bakteriologisches Institut

Planta, 53, 45—52 (1959)

From the Department of Botany, University of California, Los Angeles, California, U.S.A.

PHOTOPERIODIC CYCLES OF DIFFERENT LENGTHS IN RELATION TO FLOWERING IN BILOXI SOYBEAN (GLYCINE MAX L.; MERR.)

By

K. K. NANDA and K. C. HAMNER

With 1 Figure in the Text

(Eingegangen am 20. Dezember 1958)

HAMNER and BONNER (1938), HAMNER (1940), MANN (1941), and SNYDER (1940) have shown that in *Xanthium pennsylvanicum* a single long dark period will cause the plant to flower if preceded by an adequate light period. The response, however, is more rapid and more female inflorescences are produced if several inductive cycles are given. In the case of soybean, however, at least three photo-inductive cycles (each consisting of a short light period and a long dark period) are required to produce floral primordia in all the plants (BORTHWICK and PARKER 1938, HAMNER 1940). It has been shown that the rate of floral development depends upon the number of cycles of treatment (BORTHWICK and PARKER 1938). HAMNER (1940) and BLANEY and HAMNER (1957) have further shown that the total number of floral nodes formed increases almost in direct proportion to the number of photoinductive cycles of treatment. LONG (1939) showed that the short day cycles must be given in direct succession to induce flowering and that flowering will not occur if favourable inductive cycles are separated by one or more noninductive cycles.

During the course of investigations on the effect of varying lengths of the photoperiod and the dark period on the flowering response of Biloxi soybean, it has been shown that an endogenous rhythm markedly affects the photoperiodic response of this plant (BLANEY and HAMNER 1957, NANDA and HAMNER 1955, 1958). Thus, with eight hour light periods in each cycle, the floral initiation showed maxima with cycle lengths of 24, 48 and 72 hours and minima with cycle lengths of 36 and 60 hours. It was also found that, while the values of the three maxima reached more or less the same level, the minimum value with a cycle length of 60 hours was much greater than that with 36 hour cycle length. In fact plants exposed to 36 hour cycles showed complete lack of flower bud initiation in most of the experiments. On the basis of these results it was postulated that the rhythmical process (which is of 24 hour

duration at ordinary temperature) which affects the photoperiodic response of this plant, is inhibitory in nature and, thus, the flowering in Biloxi soybean is the net result of the balance between the flowering stimulus 'C' (which is formed by the interaction of the high intensity light substance(s) 'A' and the dark reaction(s) 'B' — HAMNER 1940) and the rhythmical inhibitory process with phases of increasing and decreasing ability to inhibit the floral stimulus 'C' (NANDA and HAMNER 1955, 1958). In order to further elucidate the nature of this rhythmical process, it was considered of interest to investigate (1) how these 36 hour cycles (consisting of 8 hours of light period and 28 hours of dark period) which have been found to be unfavourable for floral induction, affect the flowering response when these are intercalated between the favourable 24 hour cycles (consisting of 8 hours of light period and 16 hours of dark period), and secondly if the 24 hour duration of the rhythm which is found in these experiments is due to genetic factors or it is due to the fact that plants receive a 24 hour diurnal variation of light and darkness in the greenhouse before they are exposed to the photoinductive cycles.

Experimental Procedure

Biloxi soybean (*Glycine max* L; MERR.) seed used in these experiments was generously supplied by Dr. H. A. BORTHWICK, Principal Plant Physiologist, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland. Seeds were sown in 4″ unglazed earthen pots containing friable sterilized soil. In Experiment 1 the pots were kept in the greenhouse under long day illumination (about 20 hours of light and 4 hours of darkness), while in Experiment 2 half of them were kept in the greenhouse and the other half were kept in a chamber to receive 36 hour cycles (8 hours of light and 28 hours of dark period) from the time of planting. The pots were adequately manured and were inoculated with root nodule bacteria. After the first primary leaf had fully expanded in most of the pots the seedlings were thinned to leave two uniform plants in each pot. When the third trifoliate leaf was fully expanded pots were divided into groups and were given the photoperiodic treatments as listed below in each experiment. After the respective photoperiodic treatments, each group was removed to the greenhouse and kept under long day conditions for 35 days after which they were dissected to determine the number of nodes showing flower bud initiation. A battery of slim-line cool white fluorescent tubes providing an illumination of about 1,000 foot candles (as measured with a Weston foot candle meter) at the upper leaf surface were used to give photoperiods of the desired durations. Similar illumination was used for the light period in the chamber where the plants received 36 hour cycles in Experiment 2. The temperature under these lamps was about 27° C and remained fairly uniform. Dark treatment was provided in dark chambers under normal daily temperature in the basement (27° C).

Experimentation and Results

Experiment No. 1. Seeds of Biloxi soybean were sown in a greenhouse under long day illumination on December 30, 1955. On February 2, 1956, sixty eight of these pots, with two plants in each, were transferred to the basement and were exposed to 8 hours of illumination at 27° C. After the completion of the photo-

period pots were divided into two lots. In the first lot there were nine groups of 4 pots each. These were transferred to the dark chamber and were exposed to 8, 12, 16, 20, 28, 32, 40, 52, and 64 hours of darkness respectively. Each group received 7 cycles of 8 hours of illumination and the respective duration of darkness. In lot II, eight groups of 4 pots each were exposed to varying numbers of 24 and 36 hour cycles (consisting of 8 hours of illumination and remaining period of darkness) either singly or in combination. Thus groups 10 and 11 received 3 and 4 cycles of 24 hour duration respectively, while, on the other hand, groups 12 and 13 received 3 and 4 cycles respectively of 36 hour duration. In groups 14 and 15 plants were exposed alternately to 24 and 36 hour cycles, the total number of these together being 7. In group 14 plants first received a 24 hour cycle so that out of seven cycles four were of 24 hour duration while three were of 36 hour duration. On the other hand in group 15 the first cycle was of 36 hour duration so that out of seven cycles plants of this group received three 24 hour cycles. In the last two groups also 24 hour cycles alternated with 36 hour cycles but the plants received seven cycles of each (i.e. seven 24 hour and seven 36 hour cycles) instead of a total of seven cycles as in groups 14 and 15. The only difference in the plants of groups 16 and 17 was that while in the former the first cycle was of 24 hour duration and therefore the last one of 36 hour duration, in the latter the first cycle was of 36 hour duration and the last one of 24 hour duration.

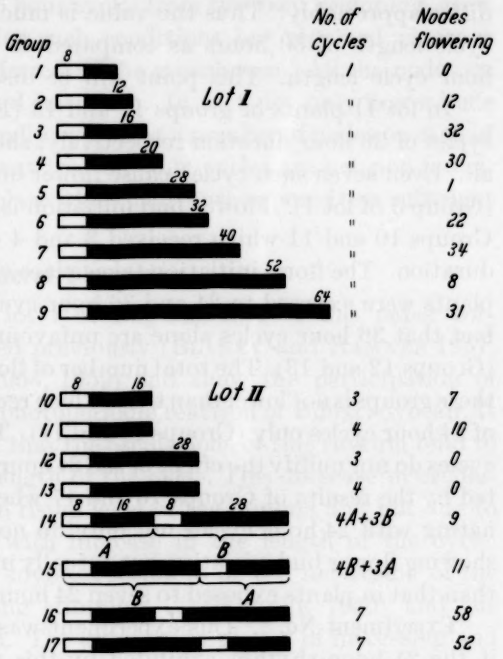


Fig. 1. *Lot I*: Effect of seven cycles each consisting of 8 hour photoperiod and dark periods of 8 to 64 hours duration, on the number of nodes containing flower buds in 8 plants. *Lot II*: Effect of varying numbers of 24 and 36 hour cycles (each consisting of 8 hours of photoperiod and the remaining period of darkness) either singly or in combination, on the number of nodes containing flower buds in 8 plants. Empty rectangles represent the length of the photoperiod while the blackened ones the length of the dark period

The various treatments along with the total number of nodes showing floral bud initiation in 8 plants are shown in Fig. 1. The results of lot I show that the flower bud initiation exhibits a rhythmical pattern with an increase in the length of the photoperiodic cycle. Thus the flower bud initiation changes with cycle length, with maximum responses at cycle lengths of 24, 48 and 72 hours and with minimum responses at cycle lengths of 36 and 60 hours. These results, thus, corroborate the findings of the previous experiments (NANDA and HAMNER 1955, 1958) and lend further support to the idea that an endogenous rhythm at times promoting

and at times inhibiting the photoperiodic response of this plant was operating in these experiments. It may be noted that the values of number of nodes showing floral initiation reach more or less the same level at the three maxima with cycle lengths of 24, 48, and 72 hours. The values of the minima with cycle lengths of 36 and 60 hours, however, differ appreciably. Thus the value is much higher in plants receiving a cycle length of 60 hours as compared to that of plants exposed to 36 hour cycle length. This point will be discussed later.

In lot II plants of groups 12 and 13 (Fig. 1) which received 3 and 4 cycles of 36 hour duration respectively, show no flower bud initiation at all. Even seven such cycles cause flower bud initiation only in one node (Group 5 of lot I). Flower bud initiation is, however, shown by plants of Groups 10 and 11 which received 3 and 4 cycles respectively of 24 hour duration. The floral initiation takes place even in groups 14 and 15 where plants were exposed to 24 and 36 hour cycles alternately, in spite of the fact that 36 hour cycles alone are unfavourable for flower bud initiation (Groups 12 and 13). The total number of flower buds initiated in plants of these groups is not lower than those which received a corresponding number of 24 hour cycles only (Groups 10 and 11). This indicates that the 36 hour cycles do not nullify the effect of the 24 hour cycles. This is further supported by the results of Groups 16 and 17 where seven 36 hour cycles alternating with 24 hour cycles not only do not inhibit the number of nodes showing flower bud initiation but actually increase it to much higher level than that in plants exposed to seven 24 hour cycles only (Group 3 of lot I).

Experiment No. 2. This experiment was actually designed to find out if the 24 hour rhythm exhibited by this plant in its photoperiodic response is due to genetic factors or it is merely due to the fact that the plants are kept under a diurnal variation of light and darkness of 24 hour duration in the greenhouse before these are carried to receive the desired photoperiodic treatment. Seeds were, thus, sown in 40 pots on February 21, 1956 and were immediately divided into two lots. Twenty pots of the first lot were transferred to a chamber to receive 36 hour cycles consisting of 8 hours of high-intensity light and 28 hours of dark period from the very beginning, while twenty pots of lot II were left behind in the greenhouse under long day (consisting of a 20 hour light period and a 4 hour dark period). On April 8, 1956 each lot was divided into 2 groups of 10 pots each. Group 1 of lot I was exposed to seven 24 hour cycles (8 hours light and 16 hours dark) while group 2 of this lot was left behind to receive 7 more of the 36 hour cycles. Similarly in lot II plants of group 1 were exposed to seven 24 hour cycles while those of group 2 were given seven 36 hour cycles. After the respective photoperiodic treatments, plants of both the lots were transferred to the greenhouse under long day conditions and were dissected after 35 days in each case.

It was found that in group 2 of lot II, where plants received seven 36 hour cycles after they were kept in the greenhouse, there was no flower bud initiation. In group 1 of this lot (receiving seven 24 hour cycles after growing in long day in the greenhouse) there were 44 nodes which showed flower bud initiation in 10 plants dissected. Plants of both the groups of lot I, which were kept under 36 hour cycles from the very beginning, grew poorly during their stay under such conditions but regained vigorous growth after these were transferred to the greenhouse. All the nodes on these plants showed flower bud initiation. In fact not only flower buds were initiated but flowers actually opened at a number of nodes on each of these plants. It is thus evident that 36 hour cycles are not non-inductive and that flowering takes place when plants are exposed to a sufficient number of such cycles.

General Discussion

The results presented in lot I of Experiment 1 of this paper corroborate the findings presented previously (Blaney and Hamner 1957, Nanda and Hamner 1955, 1958, 1959) and show the participation of an endogenous rhythm in the photoperiodic reaction of Biloxi soybean. It is also clear from these results that the oscillations of this rhythm tend to decrease gradually with the length of the cycle. This decrease in oscillations appears to be due to the rising level of the minima and not due to the falling level of maxima with increase in the length of the cycle. Thus, the flowering in Biloxi soybean seems to be the net result of the balance between the flowering stimulus 'C' (Hamner 1940) and the rhythmical inhibitory process. The alternating phases of increasing and decreasing inhibition appear to be of 24 hour duration at ordinary temperature, so that the level of flowering attained in plants exposed to a given cycle will be dependent on whether the given cycle length falls in the increasing or decreasing inhibitory phase of this process. The flowering stimulus 'C', presumably, is inhibited to the greatest extent with cycle lengths of 12, 36 and 60 hours where minimum initiations occur and to the least extent with cycle lengths of 24, 48 and 72 hours which show maximum values (lot I of Fig. 1).

That flowering in Biloxi soybean is the net result of balance between the flowering stimulus 'C' and the rhythmical inhibitory process is also indicated by the fact that, while flower bud initiation takes place when plants are exposed to only three 24 hour cycles (Group 10 of lot II in Fig. 1), flower buds are hardly initiated even when plants are exposed to seven 36 hour cycles (Group 5 of lot I in Fig. 1). It is postulated that, in 24 hour cycles where the rhythmical inhibition is minimum, the floral stimulus 'C' is accumulated rapidly and that the critical level above which flowering can be induced is reached in three cycles. With 36 hour cycles

where the inhibition is at its maximum, there is nearly a balance between the flowering stimulus 'C' and the inhibitory process and consequently the floral stimulus does not accumulate to the critical level even when plants are exposed to seven 36 hour cycles. Experiment 2 which was actually performed with a different objective in view, substantiates this point. It is seen that floral bud initiation takes place in both the groups of lot I, where plants were kept under 36 hour cycles from the time of sowing. It clearly means that the 36 hour cycles are not non-inductive, although the floral stimulus accumulates at a much slower rate under this cycle length as compared with that under 24 hour cycles, so that the critical level is reached only if the plants are exposed to more than seven 36 hour cycles. The fact that flowering occurs even when plants are exposed to 36 hour cycles, where the inhibition of the floral stimulus is maximum, indicates that the formation of the flowering stimulus 'C' is more than that can be inhibited or inactivated by the inhibitory process even when it is at its maximum level, so that there is some accumulation of the same with each cycle. This point is further borne out by the fact that, in plants of groups 16 and 17 of lot II (Experiment 1) which received seven 36 hour cycles in addition to seven 24 hour cycles, the number of nodes showing flower buds is 58 and 52 respectively as compared with only 32 in plants exposed to seven 24 hour cycles only (Group 3 of lot I in Fig. 1). This higher level of flowering in the plants of the former two treatments is apparently due to the additional floral stimulus that accumulates with seven 36 hour cycles over and above that which accumulates with seven 24 hour cycles.

The existence of inhibitory effects in plants has been postulated by some workers previously. LANG (1942) has suggested an inhibitory action of leaves for the long day plant *Hyoscyamus niger* to explain its flowering when defoliated under short day conditions. WAREING (1954) has also interpreted some experiments on the effect of light breaks in long dark periods by suggesting that an inhibitor is formed. More recently SCHWABE (1956) has also provided evidence of the inhibitory effect of long days in his experiments on *Kalanchoe blossfeldiana* in which periods of short day treatment were interrupted by intercalated long days. It was found that single long days intercalated between numbers of short days have a positive inhibitory effect on floral initiation and were not merely ineffective. One unfavourable long day cycle was estimated to annul the effect of about $1^1/_2$—2 favourable short day cycles. It was further shown that this inhibition is not additive and no accumulation takes place if a number of long days succeed one another. The 36 hour cycles used in the present experiments, therefore, differ in their effect from the non-inductive long days used to intercalate short days by SCHWABE (1956). This difference in the two cases appears to be due to the fact that, in

36 hour cycles while both the production of flowering stimulus 'C' and the inhibitory process are going on side by side, the net result is the accumulation of the floral stimulus, even though it may be in very small quantities (due to inhibition being maximum under this 36 hour cycle). Under long day conditions the floral stimulus 'C' is not formed at all due to the lack of the dark reaction 'B' (HAMNER 1940). It may be pointed out here that the rhythmical response in flowering exhibited by Biloxi soybean when exposed to 8 hour photoperiod and dark periods varying from 8—64 hours, can not be explained on the scheme proposed by SCHWABE (1956) to explain his results on *Kalanchoe blossfeldiana*.

Summary

1. Biloxi soybean seeds were sown in pots in the greenhouse. In Experiment 1 pots were divided into two lots. Nine groups of lot I were exposed to seven cycles consisting of 8 hour photoperiod and dark periods varying from 8—64 hours respectively. Eight groups of lot II were exposed to varying numbers of 24 and 36 hour cycles (consisting of 8 hour photoperiod and the remaining period of darkness) either singly or in combination so that the 36 hour cycles were intercalated between the 24 hour cycles. In Experiment 2 pots were divided into two lots immediately after sowing. Plants of lot I were transferred to a chamber to receive 36 hour cycles, while those of lot II were left in the greenhouse under long day condition. After the third trifoliate leaf was fully expanded each lot was divided into two groups. Plants of one group in each lot were exposed to seven 36 hour cycles while those of the other group were given seven 24 hour cycles. Records were made of the number of nodes showing flower bud initiation.

2. The flower bud initiation shows a rhythmical pattern in relation to cycle length. The length of this rhythm appears to be of 24 hour duration. The maxima in the number of nodes showing floral initiation are shown with cycle lengths of 24, 48, and 72 hours while the minima are exhibited with cycle lengths of 36 and 60 hours. The values of the three maxima reach more or less the same level. The minimum at 60 hour cycles has, however, a much higher value than the minimum at 36 hour cycles.

3. While the flower buds are initiated with only three 24 hour cycles, flower buds are hardly initiated even when plants are exposed to seven 36 hour cycles. The 36 hour cycles are, however, not non-inductive as is clear from the fact that flowering takes place when plants are exposed to greater number of 36 hour cycles.

4. The 36 hour cycles when intercalated between the favourable 24 hour cycles do not nullify the effect of the 24 hour cycles. In fact they actually increase appreciably the number of nodes showing flower

bud initiation as compared with the plants exposed to 24 hour cycles only. This also shows that the 36 hour cycles are not non-inductive.

5. It is postulated that the flowering in this plant is the net result of the balance between the flowering stimulus 'C' (Hamner 1940) and the rhythmical process which is inhibitory in nature. The results have been discussed in relation to those obtained by Schwabe (1956) in his experiments with *Kalanchoe blossfeldiana* in which periods of short day treatment were interrupted by intercalated long days.

References

Blaney, L. T., and K. C. Hamner: Interrelations among effects of temperature, photoperiod and dark period on floral initiation of Biloxi soybean. Bot. Gaz. **119**, 10—24 (1957). — Borthwick, H. A., and M. W. Parker: Photoperiodic perception in Biloxi soybeans. Bot. Gaz. **100**, 374—387 (1938). — Influence of photoperiods upon the differentiation of meristems and blossoming of Biloxi soybeans. Bot. Gaz. **99**, 825—839 (1938a). — Hamner, K. C.: Interrelation of light and darkness in photoperiodic induction. Bot. Gaz. **101**, 658—687 (1940). — Hamner, K. C., and J. Bonner: Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. Bot Gaz. **100**, 388—431 (1938). — Lang, A.: Übertragung der Hemmwirkung der Blätter auf die Blütenbildung bei *Hyoscyamus niger* in Kurztagbedingungen durch Pfropfung. Naturwiss. **30**, 590—599 (1942). — Long, E. M.: Photoperiodic induction as influenced by temperature, relative humidity, and previous photoperiodic treatments. Bot. Gaz. **101**, 168—188 (1939). — Mann, L. K.: Effect of some environmental factors on floral initiation in *Xanthium*. Bot. Gaz. **102**, 339—356 (1941). — Nanda, K. K., and K. C. Hamner: Investigations on the endogenous rhythm in the photoperiodic responses of Biloxi soybean. Plant physiol. **39**, Suppl., xx—xxi (1955). — Studies on the nature of the endogenous rhythm affecting photoperiodic response of Biloxi soybean. Bot. Gaz. **120**, 14—25 (1958). — The effect of temperature, auxins, antiauxins and some other chemicals on the endogenous rhythm affecting photoperiodic response of Biloxi soybean (*Glycine max* L: Merr.). Planta (Berl.) **53**, 53—68 (1959). — Schwabe, W. W.: Evidence for a flowering inhibitor produced in long days in *Kalanchoe blossfeldiana*. Ann. Botany. **77**, 1—14 (1956). — Snyder, W. E.: Effect of light and temperature on floral initiation in Cocklebur and Biloxi soybean. Bot. Gaz. **102**, 302—322 (1940). — Wareing, P. F.: Experiments on the 'light-break' effect in short day plants. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 157—172 (1954).

Dr. K. K. Nanda, Department of Botany, University of Delhi, Delhi 8, India

Dr. K. C. Hamner, Department of Botany, University of California, Los Angeles 24, California USA

Planta, 53, 53—68 (1959)

From the Department of Botany, University of California, Los Angeles, California, USA

THE EFFECT OF TEMPERATURE, AUXINS, ANTIAUXINS AND SOME OTHER CHEMICALS ON THE ENDOGENOUS RHYTHM AFFECTING PHOTOPERIODIC RESPONSE OF BILOXI SOYBEAN (GLYCINE MAX. L.; MERR.)

By

K. K. NANDA and K. C. HAMNER

With 2 Figures in the Text

(Eingegangen am 20. Dezember 1958)

Several instances have been recorded where an endogenous rhythm induced by 12:12 hour alternation of light and darkness persists after the plant has been transferred to a constant environment. These relate to leaf movement (BÜNNING 1931, 1932, 1956), exudation (GROSSENBACHER 1939) and growth of tissue cultures (BÜNNING and ENDERLE 1950, ENDERLE 1951). It was shown in previous papers (BLANEY and HAMNER 1957, NANDA and HAMNER 1958), that there is no doubt regarding the existence of an endogenous rhythm in the photoperiodic reaction of Biloxi soybean. This rhythm is probably set into motion when the plants are exposed to light. It was also shown in those experiments that the oscillations of this rhythm tend to decrease gradually with the length of the cycle. It was further shown in those experiments that the length of the photoperiod and the temperature during the photoperiod tend to shift this rhythm and cause some change in its duration, thereby indicating that the internal rhythm is not completely independent of the external conditions. Further investigations were carried out with a view to finding out how this rhythm is affected by the temperature during the dark period and the application of various auxins, antiauxins, sucrose and some other chemicals. The results of these investigations are presented in this paper.

Experimental Procedure and Results

Experiment No. 1 was carried out at the Earhart Plant Research Laboratory at the California Institute of Technology, Pasadena. Grateful thanks are due to Professor F. W. WENT for the kind permission to use these facilities. The seeds were sown in plastic pots containing a mixture of steam sterilized gravel and vermiculite in equal proportions. The pots were perforated with a hole at the bottom to allow for the drainage of excessive water. Four seeds, graded for their size, were sown in each pot. The pots were, then, placed in racks which were arranged on wheeled trucks about 2ft. × 2ft. so that the plants could be transferred from one

condition to another. All the trucks were taken to the greenhouse which was maintained at a temperature of 23° C during the day and 17° C during the night. There was constant circulation of fresh air which has been filtered free from insects, disease spores and smog by passing it through a series of mechanical filters, an electrostatic precipitator and activated charcoal filters. The day light in this greenhouse was supplemented by artificial illumination from 18:00 p.m. to 02:00 a.m. so that the plants received long day illumination of about 20 hours till ready for experimentation.

The pots were adequately watered with deionized water and were inoculated with root nodule bacteria soon after the seedlings had come above the surface of the soil. Hoagland's nutrient solution was supplied in sufficient amounts so that the plants showed vigorous growth. After the first primary leaf had fully expanded, plants were thinned to two uniform seedlings in each pot. Each pot was fitted with a wire frame to provide support to the plants and to protect them from any damage that may otherwise have been caused during transfers. The plants were left in the greenhouse till the second trifoliate leaf was fully expanded when they were ready to receive the requisite treatments.

One hundred and twenty pots each containing 2 plants were divided into three lots of 40 pots each, Each lot was further subdivided into 10 groups of 4 pots each making a total of 30 experimental groups with 8 plants in each group. The pots were transferred to an artificially lighted room maintained at 23° C to begin the experimental treatments at 6:00 a.m. on July 30, 1955. The artificial light in the room was provided by a battery of slim-line cool-white fluorescent tubes providing an illumination of approximately 600 f.c. (as measured with a Weston foot candle meter) at the upper leaf surface. Plants were exposed to 8 hours of illumination, after which they were transferred to the respective dark chambers. The dark chambers in the Earhart laboratory are opened daily at 8:00 a.m. and 4:00 p.m. for regular transfer of plants. This was not desirable for this experiment; therefore, three wooden chambers with three shelves in each were placed in each of three dark rooms. They were placed against the wall in the rooms maintained at 23°, 17° and 10° C and were covered in front with a thick, black canvas cloth which was tied on the sides and below to avoid any exposure to light that could otherwise take place when the dark chambers were opened for regular transfer of plants. Each of these wooden chambers was provided with an exhaust fan at the top and two louvers at the base. This provided a fresh flow of air to the plants placed inside. Plants of lots I, II and III were transferred to wooden chambers in the dark rooms at 23°, 17° and 10° C respectively and the individual groups of plants in each lot were exposed to 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58 and 64 hours of darkness respectively. Upon the termination of exposure to the respective dark periods the individual groups were again carried to the artificially lighted room at 23° C for exposure to another high intensity photoperiod to begin another cycle. Each light and dark treatment was repeated in each case for 7 complete cycles. At the end of the dark period of the 7th cycle each group was taken to the light room, was kept there till 8:00 a.m. the following morning and was then transferred to the greenhouse and kept under long day conditions. The plants were dissected in each case 45 days after the termination of the treatment.

The photoperiodic treatments and the results are given in Table 1. The results are expressed as average number of nodes showing floral initiation in 8 plants and these have been plotted against cycle length in Fig. 1. The results of lot I, dark period at 23° C series (empty circles in Fig. 1) show that the flower bud initiation is maximum with a 24 hour

cycle; decreases as the cycle length increases till a minimum is shown with a cycle length of 36 hours. A further increase in the cycle length shows a rise in the flower bud initiation so that a second maximum is shown with a cycle length of 48 hours. When the cycle length is further increased to 54 hours the number of flower buds decreases till it shows a second minimum with a 60 hour cycle length. There is another rise when the length of the cycle is increased to 66 and 72 hours so that a third maximum is shown when length of the cycle is increased to 72 hours. These results confirm the findings reported previously (NANDA and HAMNER 1958) and show the existence of an endogenous rhythm at times promoting and at times inhibiting the photoperiodic reaction of this plant. The duration of the rhythm in this series, where plants are exposed to a temperature of 23° C during both the photoperiod and dark period, is 24 hours.

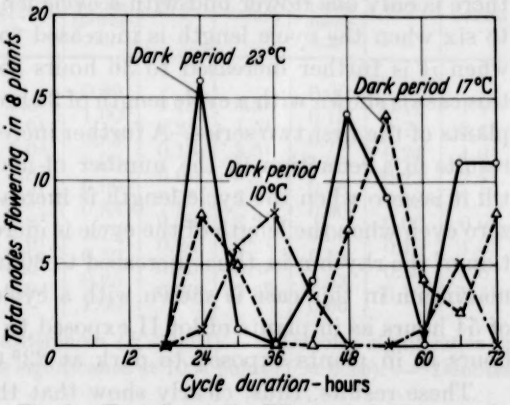


Fig. 1. (Experiment 1): Effect of 7 cycles, each consisting of an 8 hour photoperiod at 23° C and dark periods of 10 to 64 hours at a temperature of either 23° C, or 17° C or 10° C, on the number of nodes showing flower bud initiation in 8 plants

The results of lot II, the groups in which plants were exposed to dark period at a lower temperature of 17° C (triangles in Fig. 1), also show a rhythmical pattern of flower bud initiation with change in the length of the cycle. Here again the first maximum is shown with a cycle length of 24 hours. An increase in the length of the cycle decreases the number of flower bud initiation till it becomes zero with a cycle length of 36 hours. It is maintained at that level even when the length of the cycle is increased to 42 hours and shows an increase only when the cycle length is increased to 48 hours. A second maximum is reached with a cycle length of 54 hours instead of 48 hours as in lot I, with the result that the duration of the rhythm as measured by the length of the period between the first and the second maxima is increased to 30 hours in this case instead of 24 hours in plants kept at 23° C during the dark treatment. This is also evident from the fact that the second minimum is shown when the cycle length is 66 hours instead of 60 hours in lot I. Another point to be noted in this case is that, while in lot I where plants are exposed to dark period at 23°C, the maxima at 24 and 48 hour cycle lengths reach more or less the same level, in lot II where plants are given darkness at 17°C the value of flower buds at the first maximum (with 24 hour cycle) is

very low. It, however, increases at the second maximum which is shown with a cycle length of 54 hours so much so that this value of flower bud initiation approaches that of plants exposed to dark treatment at 23° C with a cycle length of 48 hours.

Lot III in which plants received dark treatment at a still lower temperature of 10° C (crosses in Fig. 1) shows that the low temperature during the dark period reduces the flower bud initiation in general and also that it increases the cycle length of the endogenous rhythm. Thus there is only one flower bud with a cycle length of 24 hours. It increases to six when the cycle length is increased to 30 hours and slightly more when it is further increased to 36 hours so that the first maximum in this case is shown with a cycle length of 36 hours instead of 24 hours in the plants of the first two series. A further increase in the length of the cycle results in a reduction in the number of nodes showing floral initiation till it is zero when the cycle length is increased to 48 hours and remains zero even when the length of the cycle is increased to 54 hours. The duration of the rhythm is, thus, increased to 36 hours in this series. A second maximum in this case is shown with a cycle length of 66 hours instead of 54 hours as in plants of lot II exposed to dark period at 17° C and 48 hours as in plants exposed to dark at 23° C.

These results, thus, clearly show that the length of the endogenous rhythm which affects the photoperiodic reaction of this plant can be altered from 24 hours to 30 and 36 hours by decreasing the temperature of the dark period from 23° C to 17° C and 10° C respectively.

The significance of the data was determined by statistical analysis and the standard errors of the differences between the mean values of floral buds initiated in plants under different cycle lengths are given in Table 1 along with the calculated values of t (difference between the means/standard error of the difference between the means). It is seen that the differences in the flower buds in plants of lot I are all significant except those between cycle lengths of 30 and 36 hours, and 66 and 72 hours. In lot II also the differences are all significant except those between 24 and 30 hour, and 60 and 66 hour cycle lengths. In lot III, while the differences in the flower buds between 18—24; 30—36; 42—48; 48—54; and 54—60 hour cycle lengths are not significant, those between 24—36; 36—48; 48—60 are highly significant. All other values in this lot are significantly different. The low level of flowering in general in this experiment was probably due to the low intensity of light (600 f.c.) to which plants were exposed during the 8 hour photoperiod as compared with 1000 f.c. of light to which plants were exposed in experiments reported previously (NANDA and HAMNER 1958). Also it may partly be due to the fact that the photoperiodic treatment in this experiment was started when only the second trifoliate leaves were fully

Table 1. *(Experiment 1), Effect of 7 cycles, each consisting of an 8 hour photoperiod at 25° C, and dark periods of 10 to 64 hours at a temperature of 25°, 17° and 10° C on the number of nodes showing flower bud initiation per plant, along with the standard errors of differences of means and the calculated values of 't'. (Difference between the means/Standard error [S. E.] of difference of means)*

Photoperiodic treatment		Temperature during the dark period								
		23° C			17° C			10° C		
Cycle length (hrs.)	Duration of darkness (hrs.)	Av. No. of nodes flowering	S. E.	*t* values	Av. No. of nodes flowering	S. E.	*t* values	Av. No. of nodes flowering	S. E.	*t* values
18	10	0.00	0.27	7.4[1]	0.00	0.18	5.5[1]	0.00	0.10	1.0[4]
24	16	2.00	0.28	3.6[1]	1.00	0.25	1.5[4]	0.13	0.18	3.4[1]
30	22	0.13	0.10	1.0[4]	0.63	0.18	3.5[1]	0.75	0.24	1.0[4]
36	28	0.00	0.18	2.8[2]	0.00	0.00	0.0[4]	1.00	0.25	2.4[1]
42	34	0.50	0.30	4.2[1]	0.00	0.23	3.4[1]	0.38	0.18	1.7[4]
48	40	1.75	0.33	1.8[3]	0.88	0.28	3.2[1]	0.00	0.00	0.0[4]
54	46	1.13	0.23	5.0[1]	1.75	0.24	5.2[1]	0.00	0.10	1.0[4]
60	52	0.00	0.25	5.5[1]	0.50	0.30	0.8[4]	0.13	0.18	2.8[2]
66	58	1.38	0.00	0.0[4]	0.25	0.30	2.5[2]	0.63	0.18	3.5[1]
72	64	1.38			1.00			0.00		

[1] Denotes highly significant differences ($P < 0.01$). — [2] Denotes significance at 5% point ($P < 0.05$). — [3] Denotes significance at 10% point ($P < 0.10$). — [4] Denotes nonsignificant results.

expanded instead of the third as was the case in the previously reported experiments.

Experiments No. 2 and 3. In the above experiment it was possible to alter the length of the rhythm by lowering the temperature during the dark period. It has also been shown previously that the length of the photoperiod and the temperature during the photoperiod tend to shift this rhythm and cause some disturbance in it (NANDA and HAMNER 1958). It has also been shown in recent years that the application of indole-3-acetic acid (IAA) affects the flowering response of both long day and short day plants. The application of IAA has been shown to cause a decrease in the magnitude of flowering in *Xanthium* and Biloxi soybean and its effectiveness is influenced by the concentration of IAA and the duration of the high intensity light (HAMNER and NANDA 1956). The following two experiments were designed to find out if IAA and other auxins, antiauxins and sucrose bring about any alterations in the endogenous rhythm affecting the photoperiodic reaction of this plant. These experiments were carried out in the plant physiology building of the University of California, Los Angeles. In these experiments seeds were sown in 4-inch unglazed earthen pots containing friable, sterilized soil, instead of plastic pots which were used in the previous experiment. After sowing, pots were transferred to the greenhouse where the plants received long day illumination of about 20 hours duration. The natural day light prevailing was supplemented by artificial illumination from sunset until 2:00 a.m. daily. Incandescent filament lamps providing light of at least 35 f.c. at upper leaf surface were used for this supplemental illumination. The pots were adequately watered with deionised water and were inoculated with root nodule bacteria as in the previous experiment. After the first primary leaf had fully expanded, the plants were thinned to two uniform

plants in each pot. The photoperiodic treatments in these experiments were started when the third trifoliate leaf was fully expanded. The photoperiods of desired duration were furnished by a battery of slim-line, cool white fluorescent tubes providing an illumination of approximately 1000 foot candles at the upper leaf surface. The temperature under these lamps during the treatment was 27° C and remained fairly uniform. Dark treatment was provided in dark chambers under normal daily temperature in the basement (27° C).

Experiment No. 2. One hundred and fifty pots, each containing 2 plants were divided into three lots of fifty pots each. Each lot was further sub-divided into groups of 5 pots each making a total of 30 experimental groups with 10 plants in each group. The pots were transferred to the basement to receive the photoperiodic treatments on November 16, 1955. The experiment involved the physical transfer of a large number of pots and there was an appreciable time lapse during transfers. In order to minimise variations due to this time lapse, a 15 minute period was allowed for transfer between each lot. Thus 50 pots each of lot I, II, and III were transferred to fluorescent lights at 10:00, 10:15 and 10:30 a.m. respectively and were exposed to 8 hours of illumination at 27° C. At the termination of the photoperiod the plants of lot II were treated with 15 p.p.m. of IAA and those of lot III were treated with 30 p.p.m. of IAA. The IAA solution was prepared by dissolving it in a few ml. of 95% ethyl alcohol and mixing it with 2 litres of deionised water in crocks. Five ml. of wetting agent, "Atlas Tween 20" was added to this solution. Fresh solutions of IAA were prepared for every treatment. The treatment of plants was made by inverting the plants and immersing the tops in a crock containing the solution for seven seconds. Plants of lot I which did not receive IAA treatment were immersed in deionised water containing an equivalent amount of alcohol and wetting agent. After IAA treatment the individual groups of plants in each lot

Table 2. *Effect of IAA on flower bud initiation in plants exposed to 7 cycles, each consisting of an 8 hour photoperiod and dark periods of 10 to 64 hours, along with the standard errors of differences of means and the calculated values of "t" (Difference between the means/Standard error of difference of means)*

Photoperiodic treatment		Concentration of IAA								
		0 p.p.m.			15 p.p.m.			30 p.p.m.		
Cycle length (hrs.)	Duration of darkness (hrs.)	Av. No. of nodes flowering	S.E.	*t* values	Av. No. of nodes flowering	S.E.	*t* values	Av. No. of nodes flowering	S.E.	*t* values
18	10	0.00	0.33	11.2[1]	0.00	0.27	3.3[1]	0.00	0.15	2.0[3]
24	16	3.70	0.43	6.1[1]	0.90	0.31	1.9[3]	0.30	0.15	2.0[3]
30	22	1.10	0.28	3.2[1]	0.30	0.15	2.0[3]	0.00	0.00	0.0[4]
36	28	0.20	0.29	4.5[1]	0.00	0.16	2.5[2]	0.00	0.00	0.0[4]
42	34	1.50	0.40	5.0[1]	0.40	0.26	2.3[2]	0.00	0.13	1.5[4]
48	40	3.50	0.36	7.0[1]	1.00	0.23	4.0[1]	0.20	0.13	1.5[4]
54	46	1.00	0.32	0.6[4]	0.10	0.10	1.0[4]	0.00		
60	52	0.80	0.39	1.8[3]	0.00	0.13	1.5[4]	—		
66	58	1.50	0.36	1.9[3]	0.20	0.26	0.8[4]	—		
72	64	2.20			0.40			—		

[1] Denotes highly significant differences ($P < 0.01$). — [2] Denotes significance at 5% point ($P < 0.05$). — [3] Denotes significance at 10% point ($P < 0.10$). — [4] Denotes nonsignificant results.

were transferred to the dark chamber to receive the following durations of darkness: 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58 and 64 hours respectively. After the completion of the dark period the individual groups were exposed to high intensity photoperiod to begin another cycle. Each group received 7 such cycles of light and darkness and the application of IAA in each case was made just after the light period. At the end of the dark period of the seventh cycle plants were returned to the greenhouse and were kept under long day conditions for 35 days after which dissections were carried out.

The photoperiodic treatments and results of each treatment are shown in Table 2. The number of nodes initiating flower buds in 10 plants are plotted against cycle length in Fig. 2. It is seen that lot I, groups in which plants received no application of IAA (empty circles in Fig. 2) show a rhythmical pattern in the number of nodes showing floral bud initiation with the length of the cycle. The maxima are found with cycle lengths of 24, 48 and 72 hours and the minima with cycle lengths of 36 and 60 hours. The results are, therefore, in conformity with the results of such treatments as reported previously (NANDA and HAMNER 1958) and in Experiment No. 1.

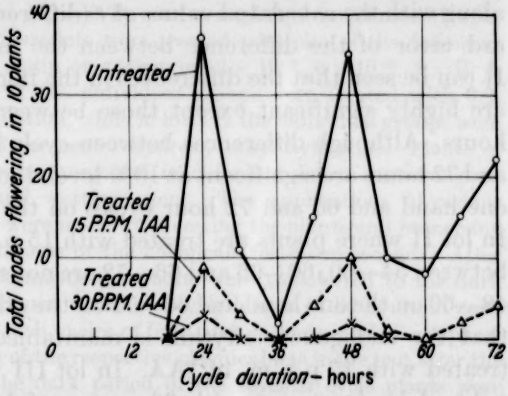


Fig. 2. (Experiment 2): Effect of 15 and 30 p.p.m. of IAA on the endogenous rhythm in Biloxi soybean. Plants were exposed to 7 cycles, each consisting of an 8 hour photoperiod and dark periods of 10 to 64 hours at 27° C, and the application of IAA in each case was made immediately after each photoperiod. The flower initiation is determined by the number of nodes showing flower bud initiation in 10 plants

Lot II in which plants were treated with 15 p.p.m. of IAA after each photoperiod (triangles in Fig. 2) shows that IAA treatment causes a considerable reduction in flower bud initiation. The maximum number of flowering nodes in this lot is 9 with a cycle length of 24 hours and 10 with a cycle length of 48 hours as compared with 38 and 37 in lot I in which plants did not receive any IAA treatment. It may be noted that, although flower bud initiation is very much reduced in IAA treated plants, the rhythmical pattern of flowering is not affected. Thus the maximum number of nodes showing floral initiation are shown with 24 and 48 hour cycles and minima are shown with cycle lengths of 36 and 60 hours as in plants of lot I which did not receive IAA treatment. This point is further borne out by plants of lot III which were treated with 30 p.p.m. of IAA instead of 15 p.p.m. as in lot II. The floral bud initiation is still further reduced in this case, so much so that it is inhibited in plants exposed to all cycle lengths other than 24 and 48 hours, and even

here the number of nodes showing floral buds in 10 plants is just 3 and 1 respectively. Plants treated with 30 p.p.m. of IAA and exposed to cycle lengths longer than 54 hours did not survive.

The results of this experiment were also subjected to statistical analysis. The standard errors of the differences between the mean values of nodes showing floral initiation in plants exposed to different cycle lengths along with the calculated values of t (difference between the means/standard error of the difference between the means) are shown in Table 2. It can be seen that the differences in the floral buds in treatments of lot I are highly significant except those between cycle lengths of 54 and 60 hours. Although differences between cycle lengths of 60 and 66; and 66 and 72 hours are significant at 10% level, those between 48 and 60 on the one hand and 60 and 72 hour cycles on the other are highly significant. In lot II where plants are treated with 15 p.p.m. of IAA, the differences between 54—60, 60—66 and 66—72 are not significant, but those between 48—60 on the one hand and 60—72 on the other are significant, indicating that the endogenous rhythm is maintained even when the plants are treated with 15 p.p.m. of IAA. In lot III where flowering is markedly reduced by treatment with 30 p.p.m. of IAA, the differences between 18—24 hour and 24—30 or 36 hour cycle lengths are significant at 10% level, those between 36 or 42—48 hour cycle lengths are not significant even at 10% level. Even though the flower bud initiation is greatly inhibited by a higher concentration of IAA, some flowering with cycle lengths of 24 and 48 hours is indicative of the fact that there is tendency for the rhythm to be maintained.

Experiment No. 3. In the previous experiment it was seen that IAA decreases the magnitude of flowering in Biloxi soybean. It, however, does not seem to affect the endogenous rhythm. The following experiment was performed to investigate if this endogenous rhythm can be affected by treatment with some other chemicals including auxins, antiauxins and sucrose. As the purpose of this experiment was to investigate the effect of various concentrations of as many chemicals as possible, plants were exposed to only 36 hour cycle length consisting of 8 hours of photoperiod and 28 hours of dark. It has been seen in all the previous experiments that the floral bud initiation is either completely suppressed or is at a minimum level when plants are exposed to this cycle length at normal temperature. When, however, the temperature during the photoperiod or the dark period was altered or if the length of the photoperiod (at lower temperature) was increased, the endogenous rhythm was either shifted or changed in its duration, with the result that plants showed floral bud initiation even when exposed to 36 hour cycle length. A floral bud initiation with 36 hour cycle length would, thus, indicate that the particular treatment probably has an effect on the endogenous rhythm which could later on be confirmed by performing a detailed experiment with that chemical as with IAA in Experiment No. 2.

One hundred and sixty-five pots each containing 2 plants were divided into 8 lots as follows: lot I to V, 25 pots each; lot VI, 20 pots; lot VII, 15 pots and lot VIII, 5 pots. Each lot was further subdivided into groups of 5 pots each, making a total

of 33 experimental groups. Plants were transferred to the basement to receive the photoperiodic treatment on January 8, 1956. Because of the large number of plants and the large number of treatments, an interval of 15 minutes was allowed between the transfers of different lots. Thus different lots were transferred to fluorescent light between 10:30 a.m. to 12:15 p.m. respectively and were exposed to 8 hours of illumination at 27° C (approximately 1000 f.c.). At the end of the light treatment plants of lots I to V were treated with indole 3-acetic acid (IAA), naphthalene acetic acid (NAA), 2-4-dichlorophenoxy isobutyric acid (2,4-di, cl), 2,4,6-trichlorophenoxy acetic acid (2, 4, 6-T), and a-naphthyl maleimide (Naph. mal.). The five groups of each of these lots were treated with one of the following concentrations of the respective auxin or antiauxin: 2×10^{-3}, 6×10^{-3}, 2×10^{-2}, 6×10^{-2} and 1.2×10^{-1}. In lot VI the individual groups were treated with 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 per cent sucrose solution, while in lot VII the individual groups were treated with 0.01, 0.06, and 0.12 per cent β-hydroxy ethyl hydrazine. Plants of lot VIII served as control and were immersed in deionised water containing an equivalent amount of alcohol and wetting agent. The applications of various concentrations of these chemicals were made by inverting the plants and immersing the tops in crocks containing solutions of the chemicals for seven seconds. After treatment with the respective chemicals the plants were transferred to the dark room and were left there for 28 hours, making a cycle length of 36 hours in each case. Each group received seven such cycles of light and darkness and the application of the requisite concentration of the respective chemical was made just after the photoperiod. After the end of the dark period of the seventh cycle plants were returned to the greenhouse and were kept under long day for 35 days after which they were dissected to determine the number of nodes showing flower bud initiation.

It was found that none of the various concentrations of auxins, antiauxins, sucrose and ß-hydroxy ethyl hydrazine caused flower bud initiation in plants exposed to 36 hour cycle length. The controls were also vegetative.

General Discussion

The results presented in Experiments No. 1 and 2 of this paper confirm the findings of BLANEY and HAMNER (1957) and NANDA and HAMNER (1958) reported in previous papers and show the participation of an endogenous rhythm in the photoperiodic reaction of Biloxi soybean. Thus plants exposed to a photoperiod of 8 hours with varying durations of the dark period in lot I of both Experiments 1 and 2 exhibit a rhythmical pattern of flowering with their maxima and minima occuring at 24 hour intervals. This 24 hour periodicity in the occurrence of maxima and minima, as pointed out in the previous paper, suggests the presence of a rhythmical process operating within these plants. It was postulated in the previous paper that this rhythmical process operating inside this plant is inhibitory in nature. It was also postulated there that the level of flowering attained in plants exposed to a given cycle length will be determined by the net balance in the activity between C (the flowering stimulus of HAMNER, 1940) and the rhythmical process inhibiting the flowering stimulus C and will depend upon whether the given cycle length falls in the increasing or decreasing inhibitory phase of the latter process.

That the flowering in Biloxi soybean is the net result of the balance between the flowering substance C and rhythmical inhibitory process is shown by another experiment in which it was found that while flower bud initiation takes place when plants are exposed to only three 24 hour cycles, no flower buds are initiated even when plants are exposed to seven 36 hour cycles. When, however, the plants are treated with a greater number of 36 hour cycles the nodes show flower bud initiation, indicating thereby that in 24 hour cycles where the rhythmical inhibition is minimum, the floral stimulus C is accumulated much faster so that a critical level above which flowering will be caused is accumulated in three 24 hour cycles. With 36 hour cycles where the inhibition is maximum, the balance of the flowering substance C and inhibitory process is very small and it takes many 36 hour cycles for the floral stimulus to accumulate to a level above the critical for floral bud initiation (NANDA and HAMNER 1959).

The results of the first experiment where plants were exposed to 17° and 10° C respectively during the dark period also exhibit a rhythmical pattern of flowering. Low temperature during the dark period, however, affects the periodicity of maxima and minima. Thus in lot II the first maximum is shown with a cycle length of 24 hours and the second with a cycle length of 54 hours instead of 48 hours as in lot I. Similarly minima are found with cycle lengths of 36 and 66 hours. Thus the duration of the rhythm which is 24 hours in lot I is prolonged to 30 hours in lot II. In lot III it is still further prolonged to 36 hours. The first maximum is shown with a cycle length of 36 hours and the minimum is prolonged to 48 and even up to 54 hours. It is thus clear that the duration of this rhythm can be modified by the temperature to which plants are exposed during the dark period.

The modifying effect of the prevailing temperature on the duration of the rhythm has also been shown by BÜNNING (1931) who found that the periodicity of leaf movement in *Phaseolus multiflorus* was approximately 24 hours at 25° C but increased to 30 hours at 15° C and dropped to 19 hours at 35° C. BÜHNEMANN (1955) showed that in the sporulation of *Oedogonium cardiacum* the speed of the rhythm decreases at higher temperatures. Thus it was found that at 25° C *Oedogonium* shows cycles of 22 hours which increases to 25 hours at a temperature of 27.5° C and decreases to 20 hours when the temperature is lowered to 17.5° C BALL and DYKE (1954) working with rhythmical changes in the growth of *Avena* coleoptile found that at low temperature the rhythm is not clearly marked. There was no indication of any material change either in the times at which the peaks occurred or in their distance apart. Similarly GROSSENBACHER (1939) who studied the rhythmical changes in the amount of exudation from decapitated plants of *Helianthus annuus* found that the length of the cycle was only slightly, if at all, influenced by change in temperature.

The effect of temperature of the dark period in increasing the periodicity of maxima and minima in these experiments may be caused by a

slowing down of the postulated inhibitory process which is rhythmical in nature with increasing and decreasing ability to inhibit the flowering stimulus C. Thus in controls the flowering stimulus may be inhibited to the least extent with cycle lengths of 24, 48 and 72 hours. When the temperature is reduced to 17° C, the rhythmical process may be slowed down so that the maximum inhibition which starts with 36 hour cycle length continues even when the cycle length increases to 42 hours and so the flowering remains suppressed even with this cycle length. As a consequence of this the second minimum inhibition of flowering stimulus C presumably is prolonged to 54 hours, so that the period between the first maximum (at 24 hours) and the second maximum (at 54 hours) is 30 hours in this case. A still further slowing down of this rhythmical inhibition occurs when temperature is still further lowered to 10° C. In this case the inhibition is greatest with a cycle length of 48 hours and continues even with a cycle length of 54 hours so that the duration of the rhythm is increased to about 36 hours.

Low temperature during the dark period depresses the number of nodes showing flower bud initiation considerably. This depressing effect of the temperature is possibly due to the low production of the flowering stimulus C as a result of insufficient dark product B (HAMNER, 1940) made during the dark period to which plants are subjected. This assumption is supported by the fact that with a cycle length consisting of 8 hours of photoperiod and 16 hours of dark at 17° C the number of flower buds is 7, it increases to 14 when the dark period is prolonged to 46 hours making a cycle length of 54 hours. This value approaches the number of flower buds initiated in the lot of plants exposed to darkness at 23° C. It indicates that at a lower temperature of 17° C a period of 46 hours of dark is sufficient to produce dark product B adequate for the maximum production of the flowering stimulus C. That the depressing effect of low temperature on flower bud initiation is possibly due to the low production of flowering stimulus C as a result of insufficient production of the dark product B is also supported by the fact that the level of flowering is still further depressed when the temperature during the dark period is lowered to 10° C. These results are in accord with the findings of BALL and DYKE (1954) who found a decrease in the mean growth rate of *Avena* coleoptile with a decrease in temperature, and GROSSENBACHER (1939) who found a considerable decrease in the amount of exudation in *Helianthus* when temperature was lowered from 30° C to 15° C.

The results of Experiment No. 2 in which plants were treated with 15 and 30 p.p.m. of IAA just after the photoperiod show that the application of IAA inhibits flowering and the magnitude of inhibition is increased with an increase in the concentration of IAA. These results are in accord with the findings in *Xanthium* and Biloxi soybean reported

previously (Hamner and Nanda 1956). IAA, however, does not alter the periodicity of the endogenous rhythm, as is shown by the rhythmical pattern of flowering even in the lots of plants treated with 15 or 30 p.p.m. of IAA, although the level of flowering is very low. These results are in conformity with those of Bühnemann (1955c) who also showed that there was no influence of IAA on rhythmical sporulation of *Oedogonium*. It appears from this that IAA does not affect the rhythmical process which is postulated to be inhibitory in nature. It is, however, interesting to note that even though the rhythmical pattern of flowering is maintained, the magnitude of inhibition caused by IAA varies with the length of the photoperiodic cycle. Thus in untreated (control) plants the maximum number of flower buds are 38 and 37 and are shown with 24 and 48 hour cycle lengths respectively. These are brought down to 9 and 10 respectively when plants are treated with 15 p.p.m. of IAA. With a cycle length of 30 hours the fall is relatively less as the number of floral buds initiated is brought down from 11 to 3. The effectiveness of IAA treatment, thus, appears to be more marked with cycle lengths showing maximal flower bud initiation as compared with the other cycle lengths. This is clearly brought out from the curves in Fig. 2. The distance between the curves for control (empty circles) and those treated with 15 p.p.m. IAA is more at 24, 48 and 72 hour cycle lengths and decreases on either side of each. This can be explained on the concept postulated previously that there are two processes operating in the initiation of flower buds, one is the formation of the flowering stimulus C as a result of the interaction of light reaction A and dark reaction B (Hamner 1940), and the other is the inhibitory process which is rhythmical in nature. In control plants the inhibitory process is at its minimal effect with cycle lengths of 24 and 48 hours so that maximum number of flower buds are formed. An application of IAA, therefore, causes a marked inhibition in flowering with these cycle lengths. With cycle length of 30 hours the inhibitory process is already in operation and causes a reduction in flowering even in plants not treated with IAA. An application of IAA increases the effect of the inhibitory process but the effect is not absolutely cumulative. It has already been shown that rate of inhibition decreases with an increase in the concentration of IAA (Hamner and Nanda 1956). This fact lends further support to the concept that the rhythmical process is inhibitory in nature and that the periodicity of flowering remains clear as long as the concentration of IAA is not high enough to suppress it. It is interesting to recall here the explanation offered by Galston and Dalberg (1954) to elucidate the mechanism of endogenous diurnal rhythms. According to these workers the endogenous diurnal rhythm begins with the adaptive formation of indole-acetic acid oxidase which is attributable to a gradual increase in

auxin level. After an adequate enzyme formation has taken place, the inactivation of auxin sets in which results in a lower auxin level. These diurnal fluctuations in concentrations are considered to be connected with the endogenous rhythm. The results presented in Experiment 2 also show that the inhibition in flowering is related to the concentration of the applied IAA. The higher the concentration, the higher is the inhibition so that it may be considered that the concentration of endogenous auxin varies rhythmically as postulated by GALSTON and DALBERG (1954) due to diurnal fluctuations in the indole-acetic acid oxidase. Such fluctuations in IAA have been reported by BECKER (1953). It has been shown that in *Kalanchoe blossfeldiana* leaves and petals show a maximum of auxin production about 3—6 hours after the beginning of the light period, and in continuous darkness followed by light-dark cycles this maximum is reached 6 + 24, 6 + 48 hours. The results of Exp. 3 in which plants were treated with various concentrations of auxins and antiauxins do not substantiate such a postulate for the rhythmical pattern of flowering in Biloxi soybean. If the endogenous rhythm were caused by diurnal fluctuations in IAA concentration, the application of antiauxins should be able to counteract the inhibitory effect of endogenous auxin so that some flowering should take place in plants treated with a suitable concentration of 2, 4, di-cl or a-naphthyl maleimide, even when exposed to 36 hour cycle length. The lack of flowering in spite of the treatment of plants with various concentrations of these antiauxins shows that probably the rhythmical inhibition is not caused by diurnal fluctuations of endogenous auxins. This assumption is further supported by another experiment (unpublished data) in which chromatographic determinations were made of the endogenous IAA in plants exposed to cycle lengths of 24 and 36 hours. According to the postulate it may be expected that IAA concentration should be higher in plants exposed to 36 hour cycle length as it is the cycle length with which plants do not show any flower bud initiation. The experiment, however, showed that the IAA concentration was much higher in plants exposed to 24 hour as compared with those exposed to 36 hour cycles. VLITOS and MEUDT (1954) also found that plants grown under photoinductive daylengths showed a much higher concentration of IAA than those grown under non-photoinductive day lengths.

It has been suggested by some workers that the endogenous diurnal rhythm is connected with changes in the whole character of metabolism and that in one phase there are catabolic and in the other phase anabolic processes predominating (BÜNNING 1942, 1944). Recent investigations of PIRSON et al. (1952, 1953 and 1954), NEEB (1952) and SCHÖN (1955) have observed a periodicity of growth, photosynthesis and respiration in the case of *Hydrodictyon*. A similar diurnal endogenous rhythm has

also been reported by Schmitz (1951) in the evolution of CO_2 in *Kalanchoe blossfeldiana*. Gregory, Spear and Thimann (1954) have also noted that CO_2 fixation in the dark and CO_2 evolution in the light increases up to a maximum and then decreases. It therefore, appears that such fluctuations in the metabolism are somehow connected with the endogenous rhythm. It has, however, been shown in Experiment 3 that the application of different concentrations of sucrose failed to induce any flower bud initiation in plants exposed to cycle lengths of 36 hours, suggesting thereby that the mechanism involved in the endogenous rhythm in the photoperiodic reaction of Biloxi soybean is not so simple and the metabolic variations which have been recorded are probably the result rather than the cause of this endogenous rhythm.

Summary

1. Biloxi soybean (*Glycine max.* L. Merr.) plants, grown in a greenhouse under long day illumination of about 20 hours, were exposed to 7 photoinductive cycles, each consisting of an 8 hour photoperiod and dark periods of 10 to 64 hours.

In the first experiment plants were divided into 3 lots. The first lot received dark period at 23° C, the second one at 17° C and the third at 10° C.

In the second experiment also plants were divided into 3 lots. The plants of one lot were treated with 15 p.p.m. of IAA; those of the second lot were treated with 30 p.p.m. of IAA, while the third lot of plants were not treated with IAA and acted as control.

In the third experiment plants were exposed to 7 cycles, each consisting of an 8 hour photoperiod and 28 hours of dark period and were treated with different concentrations of indole 3-acetic acid (IAA), naphthalene acetic acid (NAA), 2-4-dichlorophenoxy isobutyric acid (2, 4-di, cl), 2, 4, 6-trichlorophenoxy acetic acid (2, 4, 6-T), a-naphthyl maleimide (Naph. mal.), saccharose and β-hydroxy ethyl hydrazine.

After the photoinductive treatments plants were transferred back to the greenhouse and were kept under long day condition till dissected to determine the number of nodes showing flower bud initiation.

2. The flower bud initiation shows a rhythmical pattern in the photoperiodic reaction of this plant with maxima and minima occurring at 24 hour intervals in plants exposed to dark period at 23° C. The duration of the rhythm is increased to 30 hours when plants are exposed to 17° C during the dark period and to 36 hours when the temperature during the dark period is still further lowered to 10° C. This lengthening of the duration of the rhythm is ascribed to the slowing down of the rhythmical process which is considered to be inhibitory in nature.

There is a depression in the magnitude of flowering with lowering of temperature. This depressing effect of the temperature is ascribed to the low production of flowering stimulus C as a result of insufficient production of dark product B under these conditions.

3. The application of IAA inhibits flowering and the magnitude of inhibition increases with an increase in the concentration of IAA. IAA, however, does not alter the endogenous rhythm. Thus the maxima in flowering are shown with cycle lengths of 24, 48, and 72 hours even when plants are treated with 15 p.p.m. of IAA. Even in plants treated with a higher concentration of 30 p.p.m. of IAA, slight flower bud initiation is shown with photoperiodic cycles of 24 and 48 hours duration.

4. None of the various concentrations of auxins, antiauxins or saccharose used in Experiment 3 induced flower bud initiation in plants exposed to seven 36 hour cycles.

5. It is considered that the rhythmical process is inhibitory in nature with phases of increasing and decreasing ability to inhibit the flowering stimulus C (HAMNER 1940). It does not, however, appear to be related either with the diurnal fluctuations in the auxin concentrations, as postulated by GALSTON and DALBERG (1954), or to the diurnal fluctuations in the metabolism as reported by some workers. In the light of the results obtained in this paper it appears that these fluctuations in the auxin concentration and metabolism are probably the result rather than the cause of this endogenous rhythm.

Literature cited

BALL, N. G., and I. J. DYKE: An endogenous 24-hour rhythm in the growth rate of the Avera coleoptile. J. exp. Bot. **5**, 421—433 (1954). — BECKER, T.: Wuchsstoff- und Säureschwankungen bei Kalanchoe blossfeldiana in verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln. Planta (Berl.) **43**, 1—24 (1953). — BLANEY, L. T., and K. C. HAMNER: Interrelations among effects of temperature, photoperiod, and dark period of floral initiation of Biloxi soybean. Bot. Gaz. **119**, 10—24 (1957). — BÜHNEMANN, F.: Die rhythmische Sporenbildung von Oedogonium cardiacum Wittr. Biol. Zbl. **74**, 1—54 (1955). — Das endodiurnale System der Oedogoniumzelle. III. Z. Naturforsch. **10b**, 305—312 (1955a). — Das endodiurnale System der Oedogoniumzelle. IV. Planta (Berl.) **46**, 227—255 (1955b). — Das endodiurnale system der Oedogoniumzelle. II. Biol. Zbl. **74**, 691—705 (1955c). — BÜNNING, E.: Über die autonomen tagesperiodischen Bewegungen der Primärblätter von Phaseolus multiflorus. Jb. wiss Bot. **75**, 439—480 (1931). — Über die Erblichkeit der Tagesperiodizität bei den Phaseolus-Blättern. Jb. wiss. Bot. **77**, 283—320 (1932). — Untersuchungen über den physiologischen Mechanismus der endogenen Tagesrhythmik bei Pflanzen. Z. Bot. **37**, 433—486 (1942). — Die allgemeinen Grundlagen der photoperiodischen Empfindlichkeit. Flora (Jena) **138**, 93—112 (1944). — Endogenous rhythm in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **7** (1956). — BÜNNING, E., und W. ENDERLE: Endogene Tagesrhythmik bei pflanzlichen Gewebekulturen. Naturwiss. **37**, 186 (1950). — ENDERLE, W.: Tagesperiodische Wachstums- und Turgorschwankungen an Gewebekulturen. Planta (Berl.) **39**, 570—588 (1951). — GALSTON, A. W., and L. Y. DALBERG: The adaptive formation and

physiological significance of indole acetic acid oxidase. Amer. J. Bot. **41**, 373—380 (1954). — GREGORY, F. G., T. SPEAR and K. V. THIMANN: The interrelation between CO_2 metabolism and photoperiodism in Kalanchoe. Plant. Physiol. **29**, 220—229 (1954). — GROSSENBACHER, K. A.: Autonomic cycle rate of exudation of plant. Amer. J. Bot. **26**, 107—109 (1939). — HAMNER, K. C.: Interrelation of light and darkness in photoperiodic induction. Bot. Gaz. **101**, 658—687 (1940). — HAMNER, K. C., and K. K. NANDA: A relationship between applications of indole-3-acetic acid and the high intensity light reaction of photoperiodism. Bot. Gaz. **118**, 13—18 (1956). — NANDA, K. K., and K. C. HAMNER: Studies on the nature of the endogenous rhythm affecting photoperiodic responses of Biloxi soybean. Bot. Gaz. **120**, 14—25 (1958). — Photoperiodic cycles of different lengths in relation to flowering in Biloxi soybean (*Glycine max.* L. MERR.). Planta (Berl.) **53**, 45—52 (1959) — NEEB, O.: Hydrodictyon als Objekt einer vergleichenden Untersuchung physiologischer Größen. Flora (Jena) **139**, 39—95 (1952). — PIRSON, A., u. H. DÖRING: Induzierte Wachstumsperioden bei Grünalgen. Flora (Jena) **139**, 314—328 (1952). — PIRSON, A., and E. GOLLNER: Beobachtungen zur Entwicklungsphysiologie der Lemna minor L. Flora (Jena) **140**, 485—497 (1953). — PIRSON, A., J. SCHÖN and H. DÖRING: Wachstums- und Stoffwechselperiodik bei Hydrodictyon. Z. Naturforsch. **9**b, 349—353 (1954). — SCHMITZ, J.: Über die Beziehungen zwischen Blütenbildung in verschiedenen Licht-Dunkel-Kombinationen und Atmungsrhythmik bei wechselnden photoperiodischen Bedingungen. Planta (Berl.) **39**, 271—308 (1951). — SCHÖN, W. J.: Periodische Schwankungen der Photosynthese und Atmung bei Hydrodictyon. Flora (Jena) **142**, 347—380 (1955). — VLITOS, A. J., and W. MEUDT: The role of auxin in plant flowering. III. Free indole acids in short day plants under photoinductive and non-photoinductive day lenghts. Contrib. Boyce Thompson Inst. **17**(7), 413—417 (1954).

Dr. K. K. NANDA, Department of Botany, University of Delhi, Delhi 8, India.

Dr. K. C. HAMNER, Department of Botany, University of California, Los Angeles 24, California, U.S.A.

Planta, 53, 69—108 (1959)

Aus dem Staatsinstitut für Allgemeine Botanik in Hamburg

PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WUCHS- UND HEMMSTOFFE DES HAFERKEIMLINGS UND DES MAISSCUTELLUMS*

Von

HELMUT BOHLING

Mit 30 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Dezember 1958)

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit Hilfe der Papierchromatographie die Wirkstoffverhältnisse des Haferkeimlings einer Klärung näherzubringen. Die Wuchsstoffe der Haferkoleoptile sind bereits von TERPSTRA (1953) und RAADTS und SÖDING (1957) chromatographisch untersucht worden, doch stimmen diese Arbeiten in den Ergebnissen nicht restlos überein. Eine weitere Untersuchung erschien daher ratsam. Wurzel und Scutellum sollten dabei mit einbezogen werden. Allerdings wurde hier das *Mais*scutellum gewählt, weil über seinen Hemmstoff bereits zahlreiche Angaben in der Literatur vorliegen und außerdem die Bearbeitung technisch einfacher ist als beim Haferscutellum.

A. Koleoptilspitzen

1. Material und Methodik

Für die Versuche wurde anfänglich Dippes Siegeshafer (Ernte 1954, Hochzucht), später, und zwar für den größeren Teil, Carsten VII (Ernte 1954 und 1955, Nachbau) benutzt.

Die Anzucht des Hafers erfolgte in feuchtem Sägemehl in Mitscherlich-Untersätzen. Die Schalen standen zunächst am Licht, wurden aber dunkel aufbewahrt, sobald die Keimung stattgefunden hatte. Zur Gewinnung des Koleoptilspitzendiffusates wurden die etwa 0,5 cm lang abgeschnittenen Spitzen eineinhalb Stunden mit Aqua bidest. ausgelaugt (s. auch RAADTS und SÖDING 1957). In einigen späteren Versuchen wurde der Extrakt noch durch Zentrifugieren von Trübungsstoffen befreit. Das Eindampfen erfolgte gewöhnlich auf dem Wasserbad. Zeitweiliges Arbeiten mit Temperaturen von nur 40—50° im Vakuum ließ demgegenüber keine Unterschiede deutlich werden. Für einen Versuch wurden jeweils 1500 bis 2000 Koleoptilspitzen (ohne Primärblatt) verwendet, von denen das eingedampfte wäßrige Diffusat eine braune, sirupartige Masse ergab.

Die Fraktionierung der Substanz erfolgte nach der Methode der aufsteigenden Papierchromatographie, entsprechend den Angaben von CRAMER (1954). Die verwendeten Papiersorten waren Schleicher u. Schüll 602 h : p (bis zum Frühjahr 1956)

* Auszug aus einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hamburg.

und Schleicher u. Schüll 2043b mgl (während der folgenden Zeit). Neben dem Pflanzenextrakt liefen als Kontrollsubstanz stets 4—5 μg synth. Indolylessigsäure (IES) mit, deren Lage auf dem entwickelten Chromatogramm durch Besprühen mit Perchlorsäure-Eisenchlorid-Lösung (nach GORDON u. WEBER 1951) ermittelt wurde. In den meisten Versuchen wurden Extrakt- und Kontrollbahn durch ein „Fenster" (einen etwa 2 mm breiten aus dem Papier herausgeschnittenen Schlitz) getrennt, um seitliche Ausbreitung der synth. Substanz unbedingt zu verhüten. Im allgemeinen wurde das zur Trockene eingedampfte Koleoptilspitzendiffusat ohne weitere Vorbehandlungen der Papierchromatographie unterworfen, um nicht von vornherein bestimmte Stoffgruppen auszuschalten. Als Nachteil mußte so allerdings wegen der beachtlichen Substanzmenge die Gefahr nicht völlig scharfer Trennung und u. U. auch eine gewisse gegenseitige Wanderungsbeeinflussung der Komponenten in Kauf genommen werden (CRAMER 1954, FISCHER 1954).

Als Chromatographierflüssigkeit diente meistens Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak (25%ig) im Verhältnis 80:15:5 (nach FISCHER); ferner aber auch Isopropanol-Aqua bidest. 80:20, n-Butanol-Aqua bidest.-Ammoniak 10:10:1 (obere Phase) und in zwei Versuchen Äthanol-Aqua bidest.-Ammoniak 70:25:5. Das erstgenannte Lösungsmittel erreichte in 12—15 Stunden bei 22° durchweg eine Steighöhe von etwa 23 cm (Aufbewahrung dunkel in einem temperaturkonstanten Schrank). Bei der Papiersorte 602 h: p wiesen allerdings verschiedene Lieferungen beträchtliche Unterschiede im Verhalten auf. Dabei ging im allgemeinen mit zunehmender Laufzeit eines Chromatogramms eine Erhöhung im R_f-Wert des IES-Kontrolle einher. Dasselbe war auch zu beobachten, wenn durch etwas höhere Temperatur die Laufzeit verlängert war[1].

Nach dem Trocknen des entwickelten Chromatogramms, was gewöhnlich bei Zimmertemperatur unter einem großen Dunkelsturz erfolgte, wurde die Extraktbahn im biologischen Test geprüft. Das Chromatogramm wurde dazu vom Start bis zur Lösungsmittelfront in zehn gleich große Abschnitte aufgeteilt, die zweimal mit je 5 cm³ 20%igem Äthanol eine halbe oder einmal eine ganze Stunde in Porzellanschälchen eluiert wurden. Beim untersten Chromatogrammabschnitt wurde die Auftragestelle des Extraktes entweder vollständig oder doch weitgehend von der Elution ausgenommen. Die Eluate wurden auf dem Wasserbad abgedampft und die Rückstände mit Hilfe kleiner Pipetten mit wenig Lösungsmittel auf je 6 bis 8 Agarwürfel (2,5 × 2,5 × 1,3 mm, 3% Agar) geträufelt. Es kam so der Extrakt von 250 Koleoptilspitzen auf einen Würfel von jeder Chromatogrammzone. Als Kontrollpräparate beim Test dienten zwei Agarserien, die mit dem wie oben gewonnenen Eluat aus zwei Papierabschnitten oberhalb der Lösungsmittelfront des Chromatogramms („leere Zonen") versehen waren[2].

[1] Es ist überhaupt keineswegs experimentell einfach, konstante R_f-Werte zu erzielen, obwohl vom physikalisch-chemischen Gesichtspunkt der R_f-Wert einer Substanz unter genau definierten Bedingungen eine charakteristische Größe ist (CRAMER 1954, SCHAUER u. BULIRSCH 1955). Wie schwierig es aber ist, ein wirklich genau definiertes und reproduzierbares äußeres System innezuhalten, geht in aller Deutlichkeit hervor aus einer Veröffentlichung von SCHAUER u. BULIRSCH (1955).

[2] Die „leeren Zonen" bewirkten bei den Testpflanzen meist ein etwas schwächeres Wachstum als reiner Agar. Wachstumsbeeinflussende Stoffe des Papiers machten sich auch bemerkbar in dem vom aufsteigenden Lösungsmittel durchtränkten Bereich des Chromatogramms. Das zeigten „Blindchromatogramme", d.h. solche, bei denen gar keine Substanz aufgetragen war. Recht auffallend war dann eine Hemmstoffwirkung in der Frontzone, besonders im Krümmungstest (s. unten). Letzterer zeigte außerdem auch durchweg im Bereich um R_f 0,4 eine Hemmstoffwirkung. Ferner schien das Papier Stoffe zu

Als Testobjekt diente die Haferkoleoptile. Die Anzucht der Testpflanzen, für die als Saatgut „Dippes Siegeshafer" (Hochzucht) genommen wurde, erfolgte in feuchtem Sägemehl in Blumentöpfen, die bis zum Erscheinen der ersten Koleoptilspitzen am Tageslicht belassen wurden. Die weitere Aufbewahrung erfolgte im Dunkelschrank unter Dunkelstürzen.

Zur Prüfung der einzelnen Chromatogrammabschnitte auf Wuchs- bzw. Hemmstoffgehalt kam in erster Linie der „Zylindertest" mit Agarwürfeln nach FUNKE u. SÖDING 1948 (nähere Beschreibung SÖDING 1952) zur Anwendung, wenn auch mit geringen Abänderungen. Die Ablesungen wurden anfänglich zwei, vier, sechs und etwa vierundzwanzig Stunden nach dem Aufkleben des Agars auf die Testzylinder vorgenommen, vom Herbst 1955 an nur noch nach drei, sechs und vierundzwanzig Stunden (glgtl. noch einmal nach zwei Tagen).

Bei der Auswertung der Teste diente von jeder Serie der durchschnittliche prozentuale Zuwachs der Zylinder als Vergleichsgrundlage, Die Unterschiede im Zuwaohs der Einzelzylinder innerhalb der Serien waren durchweg gering, so daß bei 6—8 Zylindern je Serie ein brauchbarer Mittelwert resultierte. Traten extreme Abweichungen auf bei einzelnen Zylindern, so wurden diese nicht mitbewertet.

Recht große Unterschiede gab es bei den verschiedenen Versuchen hinsichtlich der allgemeinen Wüchsigkeit der Koleoptilzylinder. Trotz aller Bemühungen, eine möglichst große Wuchsfreudigkeit der Testpflanzen zu erzielen durch Variieren von Einzelheiten während der Anzucht, konnte dieses Ziel nicht erreicht werden. Leichte Temperaturerhöhung am Vortage des Testes erwies sich häufiger als nützlich. Möglichst vermeiden sollte man jedoch eine stärkere Beeinflussung durch bedeutend erhöhte oder verminderte Temperatur bei unbefriedigendem Entwicklungszustand kurz vor dem Test.

Ein Problem bei zahlreichen Versuchen war die unterschiedliche Wuchsstärke der Kontrollserien, von denen eine als erste, die andere als letzte des gesamten Testes verarbeitet wurde. In der Mehrzahl dieser Fälle wuchs die Anfangskontrolle besser. Die Ursache dafür kann ich nicht angeben. Als vorteilhadt erwies es sich, die Pflanzen für jede Serie mehreren Anzucht-Töpfen zu entnehmen. Darüber hinaus ist es ratsam, mehrere Zylinderserien — meist wurden vier genommen — gemeinsam herzurichten. Unterschiede in der Wüchsigkeit der Pflanzen, die etwa durch geringe Feuchtigkeitsdifferenzen zwischen den einzelnen Töpfen hervorgerufen werden können, waren so am sichersten auszugleichen.

---

enthalten, die sich bei der Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak im Bereich um R_f 0,6 häuften und die durch IES-Vorgabe erzeugte Krümmung im Hafertest steigerten. Um einen Querlauf synthetischer IES vom Kontrollstreifen handelte es sich dabei offensichtlich nicht. Vom Herbst 1955 an wurde deshalb das Chromatographierpapier stets vorgereinigt mit dem jeweils benutzten Lösungsmittelgemisch. Die Reinigung erfolgte anfänglich durch einfaches Baden in einem Becherglas, ein bis zwei Tage lang, später durch absteigende Chromatographie, wobei das Lösungsmittel durchlief. Blindchromatogramme von vorgereinigtem Papier zeigten im allgemeinen kaum noch eine Hemmwirkung der Frontzone (s. unten). Die anderen, im Krümmungstest auftretenden Unregelmäßigkeiten ließen sich durch Vorwaschen jedoch nicht beheben. (Etwas bessere Ergebnisse lieferten einige Versuche mit Whatman I-Papier.) Trotzdem sollte bei allen papierchromatographischen Arbeiten über Wirkstoffe eine Vorreinigung des Papiers nicht unterlassen werden. Soweit in der vorliegenden Arbeit der Krümmungstest mit IES-Vorgabe zur Anwendung kam, wurden die Ergebnisse stets mit der nötigen Vorsicht bewertet und vor allem nur im Vergleich zum wesentlich zuverlässigeren Zylindertest, der in den weitaus meisten Fällen angewandt wurde.

Außer dem Zylindertest kam in einigen Fällen auch der Hafer-Krümmungstest (als Tageslichttest nach SÖDING 1935 bzw. 1952) zur Anwendung. Dabei wurde jedoch den Agarwürfeln, bevor sie mit dem Pflanzenextrakt versehen wurden, eine „Vorlage" von synth. IES gegeben. Es sollten dadurch auch Hemmstoffe erfaßbar werden, die zwar die durch IES verursachten negativen Krümmungen vermindern, nicht aber für sich allein positive Krümmungen hervorbringen können. Die Konzentration der synth. IES in den Agarwürfeln betrug $2:10^7$ oder $4:10^7$, je nach den durch die jahreszeitlich wechselnde Empfindlichkeit des Testes (SÖDING u. FUNKE 1942, SÖDING 1952) bedingten Erfordernissen.

Die günstigste Größe der Testpflanzen lag für den Zylindertest offenbar bei etwa 1,5 cm Koleoptilenlänge, für den Krümmungstest bei rund 2,5 cm.

II. Versuchsergebnisse

1. Chromatographie des Rohextraktes. *a) Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak.* Als klarstes Ergebnis zeigten diese Versuche bei Anwendung des Zylindertestes einen Wuchsstoff, der in seinem R_f-Wert recht genau übereinstimmte mit der Indolylessigsäure. Dieser R_f-Wert lag durchweg bei etwa 0,45. Der Hauptwuchsstoff der Haferkoleoptile dürfte demnach also die IES sein. Geringfügige Unterschiede zwischen dem IES-Fleck der Kontrollbahn und dem Hauptförderungsgebiet der Extraktbahn sind erklärlich durch die beachtliche Menge von Begleitstoffen im Extrakt, durch die nach Literaturangaben (z.B. CRAMER 1954, FISCHER 1954) Beeinflussungen eines R_f-Wertes möglich sind.

Als zweite, meist wesentlich schwächere Förderungszone erwies sich in der Versuchsreihe vom Winterhalbjahr 1954/55 häufig, aber nicht immer, der zweite oder dritte Chromatogrammabschnitt, der R_f-Bereich um 0,2 also. Recht deutlich kam dieser Gipfel der Wirkungskurve des Chromatogramms dagegen in zwei neueren Versuchen vom Juli 1957 zum Ausdruck. Hierbei wurde das Rohdiffusat vor dem Eindampfen durch Zentrifugieren geklärt und nachher nur der leicht mit wenig Wasser aufnehmbare Teil des eingedampften Rückstandes auf das Chromatographierpapier gebracht.

Bei den letztgenannten Versuchen bestand ferner der Verdacht auf das Vorhandensein eines dritten Wuchsstoffs im Bereich um R_f 0,75. Die älteren Ergebnisse, denen die weitaus größere Zahl von Versuchen zugrunde liegt, ließen dagegen nur in einigen Fällen eine wachstumsfördernde Wirkung des fraglichen Chromatogrammabschnitts, besonders nach längerer Testdauer, erkennen.

Eine bei fast allen Versuchen auftretende Erscheinung war eine wachstumshemmende Wirkung des untersten Chromatogrammabschnittes ($R_f \leqq 0{,}1$).

Zu erwähnen bleibt noch eine Hemmwirkung der Frontzone in der Mehrzahl der Versuche, die ich jedoch auf Verunreinigungen des Papiers zurückführen möchte. Weiter trat häufiger im 9. Chromatogramm-

abschnitt eine Hemmung auf, die mir auf einem Stoff der Koleoptile zu beruhen scheint.

Bezüglich der Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist zu sagen, daß als statistisch sicher zweifellos der Heteroauxingipfel anzusehen ist. Um eine derartige Sicherheit für die übrigen Gipfel zu erhalten, wäre wohl noch eine größere Anzahl von Versuchen notwendig gewesen. Immerhin wurden hier, wie auch in allen folgenden Versuchsanordnungen, mehrere Untersuchungen ausgeführt, und die Ergebnisse vom Winter 1954/55

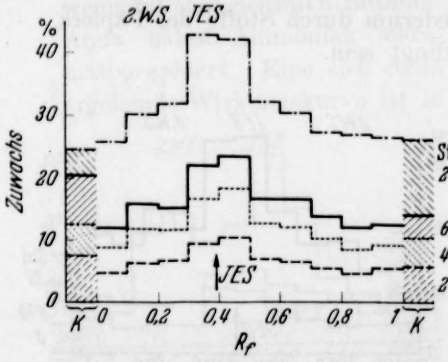


Abb. 1

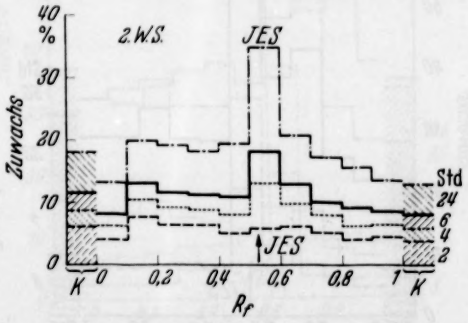


Abb. 2

Abb. 1. Durchschnittswirkungskurven von 13 Versuchen (1954/55) mit Koleoptilspitzenrohextrakt. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak 80:15:5. Abszisse: Die den R_f-Werten entsprechenden Chromatogrammabschnitte. Ordinate: Zuwachs der Testzylinder in % der Ausgangslänge. Schraffierte Säulen: Anfangs- und Endkontrolle („leere Zonen"). Der Pfeil unten gibt die Lage der synth.IES auf dem Chromatogramm an

Abb. 2. 3 Versuche mit Koleoptilspitzenrohextrakt, entsprechend Abb. 1

stützen sich auf mehr als 16 Einzelversuche. 13 davon sind in der kombinierten Wirkungskurve der Abb. 1 dargestellt. Drei weitere gleichartige Versuche, bei denen jedoch der R_f-Wert der IES höher lag, zeigt Abb. 2, während die beiden oben erwähnten Versuche vom Juli 1957 in Abb. 3 zusammengefaßt sind.

Weitere Versuche wurden mit dem „Wannentest" ausgeführt. Dabei tauchten die invers gestellten Zylinder mit der apikalen Schnittfläche in eine kleine Glaswanne, die in etwa 0,5 cm³ Lösung die Eluate der Chromatogrammabschnitte enthielt. Die aus fünf solchen Versuchen ermittelte Wirkungskurve (Abb. 4) zeigte erwartungsgemäß deutlich das IES-Maximum, daneben einen wachstumsfördernden Bereich um R_f 0,75. Letzterer war wiederum erst erkennbar bei der Messung nach einem Tag Einwirkungsdauer. Im ersten Chromatogrammabschnitt zeigte sich eine hemmende Wirkung, aber erst nach längerer Testdauer, im Gegensatz zum Testverfahren mit Agarwürfeln, wo maximale Hemmung schon gleich zu erkennen war.

Der Haferkrümmungstest ergab bei einer Vorlage synthetischer IES einen Verlauf der Wirkungskurve des Chromatogramms, der dem mit dem Zylindertest erhaltenen durchaus vergleichbar ist, besonders dem in Abb. 2 dargestellten. Die Kombination von sechs Versuchen mit Krümmungstest stellt Abb. 5 dar. Klar zum Ausdruck kommt hier das IES-Maximum, allerdings bei einem bemerkenswert hohen R_f-Wert (im Durchschnitt 0,58) und daneben der „2. Wuchsstoff". Deutliche Minima zeigt die Kurve in der untersten und obersten Zone. Letzteres mag dabei wiederum durch Stoffe des Papiers bedingt sein.

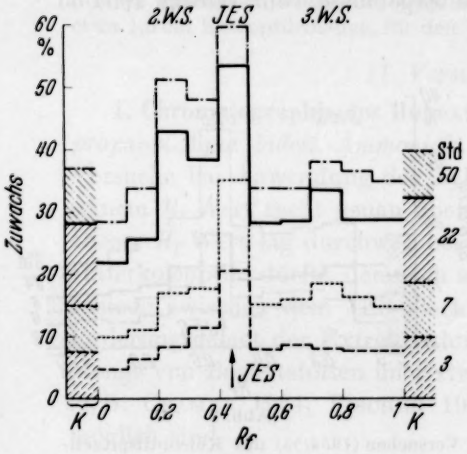


Abb. 3

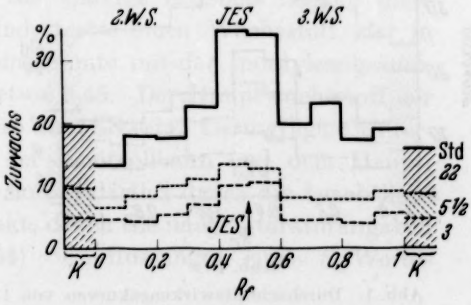


Abb. 4

Abb. 3. 2 Versuche mit Koleoptilspitzenrohextrakt (nur der leicht lösliche Anteil des eingedampften Rückstandes wurde benutzt). Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

Abb. 4. 5 Versuche mit Koleoptilspitzenrohextrakt unter Anwendung des „Wannentestes"

b) Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest. Drei Versuche wurden unter Benutzung dieses Lösungsmittelgemisches durchgeführt, das also im Gegensatz zum erstverwendeten schwach sauer reagiert. Das Bild dieser Wirkungskurve war dem früher erhaltenen ähnlich, doch wiesen IES-Maximum und auch der „2. Wuchsstoff" höhere R_f-Werte auf. Die Versuche wurden im August 1957 ausgeführt, auch mit zentrifugiertem Extrakt, von dessen eingedampftem Rückstand in zwei Fällen wieder nur der leicht lösliche Anteil verwendet wurde (Abb. 6). Auffallenderweise fehlte hier jegliche Hemmung durch den Abschnitt 1. Vorhanden war diese dagegen in mäßigem Grade bei einem weiteren Versuch, bei dem der gesamte eingedampfte Rückstand der Chromatographie unterworfen wurde. Nicht erkennbar war in letzterem Versuch allerdings der „2. Wuchsstoff". Den „3. Wuchsstoff" zeigten alle drei Versuche.

c) Chromatographie mit Äthanol-Aqua bidest.-Ammoniak. Zwei Versuche zeigten nur Wuchsstoff an der Stelle der IES ($R_f = 0{,}68$) und einen

Hemmstoff im 3. Chromatogrammabschnitt (R_f 0,2—0,3). Letzterer ist sehr wahrscheinlich identisch mit dem Hemmstoff der untersten Chromatogrammzone beim Benutzen von Isopropanol bzw. Butanol zum Chromatographieren.

d) Chromatographie mit n-Butanol-Aqua bidest.-Ammoniak. Vergleichshalber wurde in einigen wenigen Versuchen mit n-Butanol-Aqua bidest.-Ammoniak chromatographiert. Eine sich dann ergebende Wirkungskurve ist in Abb. 7 dargestellt. Eine Ähnlichkeit mit denen bei Isopropanolchromatographie ist durchaus erkennbar, doch liegen hier die R_f-Werte tiefer (IES 0,25). Demzufolge läßt sich jedoch kaum etwas aussagen über den „2. Wuchsstoff". Möglicherweise war er mitbeteiligt am Heteroauxinmaximum, das bei diesen Versuchen recht stark ausgeprägt war. Der Wuchsstoffgipfel bei R_f 0,65 ist sicherlich auf den „3. Wuchsstoff" zurückzuführen.

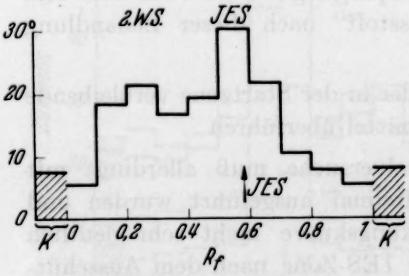


Abb. 5. 6 Versuche mit Koleoptilspitzenrohextrakt unter Anwendung des Hafer-Krümmungstestes (mit Vorlage synth. IES). Abszisse: Zonen des Chromatogramms. Ordinate: Krümmungswinkel nach 2¼ Std Testdauer. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

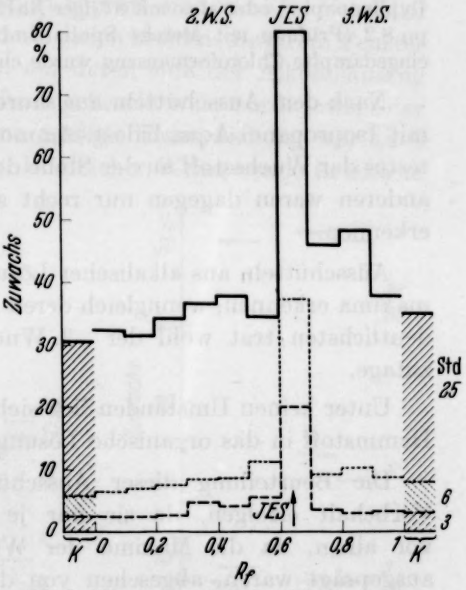


Abb. 6. 2 Versuche mit Koleoptilspitzenrohextrakt (leicht wasserlöslicher Anteil). Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest. 80 : 20

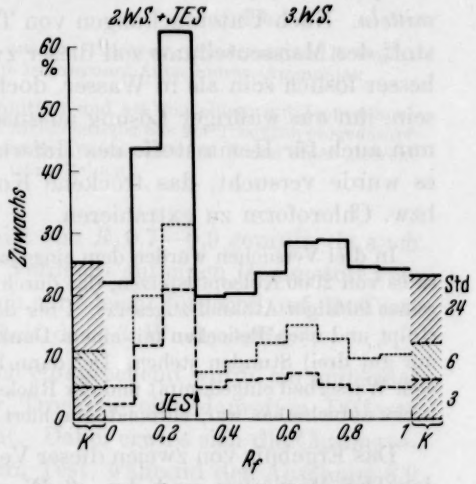


Abb. 7. Ein Versuch mit Koleoptilspitzenrohextrakt. Chromatographie mit n-Butanol-Aqua bidest.-Ammoniak

2. Chromatographie vorbehandelter Extrakte. *a) Ausschütteln mit Chloroform.* Das wäßrige Spitzendiffusat wurde zur Trockene eingedampft, mit 5 cm³ Aqua bidest.

wieder aufgenommen und im Scheidetrichter dreimal fünf Minuten mit einem Überschuß von Chloroform (gut eineinhalbfache Menge) ausgeschüttelt. Dazu wurde die wäßrige Lösung vorher mit 1,5%iger Weinsäure angesäuert auf p_H 3 (Indicator Lyphanpapier) oder aber mit 8%iger $NaHCO_3$-Lösung alkalisch gemacht, etwa auf p_H 8,2 (Prüfung mit Mercks Spezial-Indicatorpapier). Der auf dem Wasserbad eingedampfte Chloroformauszug wurde chromatographiert.

Nach dem Ausschütteln aus saurer Lösung war bei Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak und Anwendung des Zylindertestes der Wuchsstoff an der Stelle der IES noch vorhanden. Die beiden anderen waren dagegen nur recht schwach in der Wirkungskurve zu erkennen.

Ausschütteln aus alkalischer Lösung ließ hernach alle drei Zuwachsmaxima erkennen, wenngleich deren Ausprägung nur schwach war. Am deutlichsten trat wohl der „3. Wuchsstoff" nach dieser Behandlung zutage.

Unter keinen Umständen ließ sich der in der Startzone verbleibende Hemmstoff in das organische Lösungsmittel überführen.

Die Beurteilung dieser Ausschüttelversuche muß allerdings mit Vorbehalt erfolgen, da sie nur je dreimal ausgeführt wurden und vor allem, da die Maxima der Wirkungskurve nicht sehr deutlich ausgeprägt waren, abgesehen von der IES-Zone nach dem Ausschütteln aus saurer Lösung.

b) Extraktion des trockenen Rückstandes mit organischen Lösungsmitteln. Nach Untersuchungen von TEGETHOFF (1950) über den Hemmstoff des Maisscutellums soll dieser zwar in organischen Lösungsmitteln besser löslich sein als in Wasser, doch soll es andererseits nicht möglich sein, ihn aus wäßriger Lösung auszuschütteln. Diese Möglichkeit wurde nun auch für Hemmstoffe des Haferkeimlings in Betracht gezogen, und es wurde versucht, das trockene Koleoptilspitzendiffusat mit Alkohol bzw. Chloroform zu extrahieren.

In drei Versuchen wurden dem eingedampften Rückstand des wäßrigen Diffusates von 2000 Koleoptilspitzen, das durch Zentrifugieren geklärt war, etwa 8 cm^3 reiner 96%iger Äthanol zugesetzt. Über das Schälchen wurde eine Glasglocke gestülpt und nach Bedecken mit einem Dunkelsturz blieb das Ganze 18—20 (einmal nur gut drei) Stunden stehen. Der dann leicht braune Alkoholauszug wurde auf dem Wasserbad eingedampft und der Rückstand, soweit er mit schwachem Alkohol leicht aufnehmbar war, chromatographiert.

Das Ergebnis von zweien dieser Versuche zeigt Abb. 8, worin deutlich das IES-Maximum und der „3. Wuchsstoff" zum Ausdruck kommen, nicht dagegen der „2. Wuchsstoff". Klar erkennbar war letzterer jedoch im dritten Versuch dieser Art, dessen Wirkungskurve deshalb nicht mit den anderen zusammengefaßt wurde, da hier der R_f-Wert der IES um eine Zone höher lag.

Eine wachstumshemmende Wirkung des 1. Chromatogrammabschnittes war in allen Fällen nur recht schwach erkennbar. In einem Versuch wurde diese Zone noch einmal gesondert geprüft, und zwar im Vergleich zum Verhalten reinen Papiers. Von zwei gleich breiten, durch ein Fenster getrennten Chromatogrammbahnen, auf deren eine der Alkoholauszug des Extraktes von 1700 Koleoptilspitzen gebracht war, wurde jeweils der unterste Abschnitt untersucht. Eine mäßige Hemmwirkung war auch hier nicht zu übersehen (s. Abb. 9). In gleicher Weise wurde in diesem

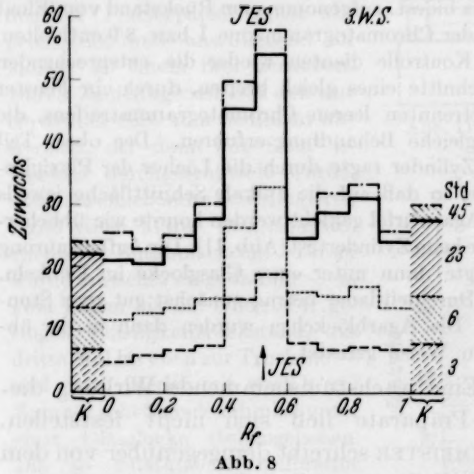


Abb. 8

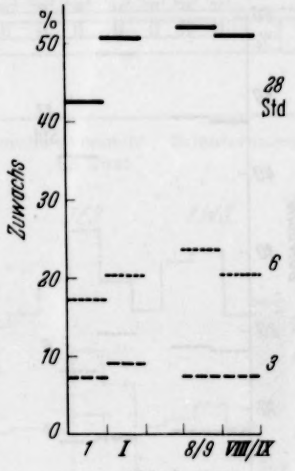


Abb. 9

Abb. 8. 2 Versuche mit dem Alkoholauszug aus zur Trockene eingedampftem Koleoptilspitzenrohextrakt. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

Abb. 9. Wirkung der Chromatogrammabschnitte 1 und 8/9 von einem mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak chromatographierten Alkoholauszug aus zur Trockene eingedampftem Koleoptilspitzenrohextrakt im Vergleich zu den entsprechenden Zonen einer „leeren" Kontrollbahn (röm. Zahlen)

Versuch der Chromatogrammabschnitt von R_f 0,7—0,9 geprüft, da auch hier nach den älteren Versuchen der Verdacht auf einen Hemmstoff vorlag. Der Alkoholauszug wirkte jedoch ganz leicht fördernd auf die Testzylinder, vielleicht infolge Anwesenheit des „3. Wuchsstoffes".

Dem zuletzt geschilderten Versuch entsprechend wurde ein andermal ein Chloroformauszug aus dem zur Trockene eingedampften Diffusat von 2000 Koleoptilspitzen untersucht. Dabei erwies sich die Chromatogrammzone 1 als völlig unwirksam im Test, während der Abschnitt 8/9 eine deutliche Förderung des Zylinderwachstums zeigte (Abb. 10). Letztere ist zweifellos auf den „3. Wuchsstoff" zurückzuführen.

c) Durchleitversuche. Nach BAUMEISTER (1950) enthält die Kartoffelknolle einen Hemmstoff, der leicht in akropetaler Richtung ein Haferkoleoptilstück durchwandert. Es erschien mir daher zweckvoll, den Hemmstoff des Koleoptilspitzen-

diffusates gleichfalls auf diese Fähigkeit zu untersuchen. Experimentell wurde hierbei ähnlich verfahren, wie es BAUMEISTER beschreibt. Von etwa 2 cm langen Haferkeimlingen wurden 1,5 mm unterhalb der Spitze 10 mm lange Koleoptilzylinder entnommen und zum Verbrauch des eigenen Wuchsstoffes einen Tag lang auf feuchtem Filtrierpapier in Petrischälchen dunkel aufbewahrt. Letztere wurden dabei möglichst vertikal gestellt, da sonst beträchtliche geotropische Krümmungen der Zylinder auftraten. Hernach wurde nochmal decapitiert (1,5 mm) zur Entfernung der inzwischen gebildeten physiologischen Spitze. Gehalten durch einen mit Bohrungen versehenen Plexiglasstreifen, der mit seinen Enden auf kleinen Holzblöckchen lag, wurden die wuchsstoffleeren Koleoptilzylinder nun aufrecht in kleine Glaswannen gestellt, die den mit wenigen Tropfen Aqua bidest. aufgenommenen Rückstand vom Eluat aus der Chromatogrammzone 1 bzw. 8/9 enthielten. Als Kontrolle dienten wieder die entsprechenden Abschnitte eines gleich breiten, durch ein Fenster abgetrennten leeren Chromatogrammstreifens, die die gleiche Behandlung erfuhren. Der obere Teil der Zylinder ragte durch die Löcher der Plexiglasleiste, so daß auf die apikale Schnittfläche jeweils ein Agarwürfel geklebt werden konnte wie üblicherweise beim Zylindertest (Abb. 11). Die Aufbewahrung erfolgte dann unter einer Glasglocke im Dunkeln. Die Durchleitdauer betrug zunächst gut zwei Stunden. Die Agarblöckchen wurden dann in der üblichen Weise getestet.

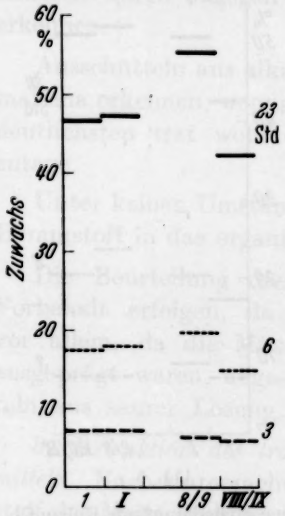


Abb. 10. Entsprechender Versuch wie in Abb. 9, aber mit einem Chloroformauszug aus dem trocknen Koleoptilspitzenextrakt

Eine wachstumshemmende Wirkung dieser Präparate ließ sich nicht feststellen. BAUMEISTER schreibt demgegenüber von dem Kartoffelhemmstoff, daß er schon nach einer Stunde 0,7 cm lange Koleoptilzylinder durchwandert habe. Da in meinen Versuchen keine Leitung erfolgte, wurde zunächst die Durchleitdauer erhöht bis zu fünf Stunden und dann außerdem die Länge der Durchleitzylinder reduziert auf 5 mm. Aber auch das hatte keinen Erfolg, weder bei der Chromatogrammzone 1 noch bei der oberen von R_f 0,7—0,9. Letztere ergab gegenüber der Kontrolle eher eine geringe Förderung.

Da das von FUNKE u. SÖDING (1948) gleichfalls in Kartoffelknollen gefundene und auch von E. MEYER (1950) bestätigte Antiauxin ebenfalls Hemmstoffwirkung zeigen kann und nach Angabe der genannten Autoren in beiden Richtungen durch die Haferkoleoptile leitbar ist, wurde auch versucht, den Haferhemmstoff in der oben beschriebenen Weise basipetal durch Koleoptilzylinder zu leiten. Auch dieses wurde mit den beiden erwähnten Chromatogrammbereichen vorgenommen. Ein hemmender Einfluß im Vergleich zur Kontrolle blieb wiederum aus. Durchweg erfolgte sogar eine leichte Förderung. Um festzustellen, ob letztere wirklich auf einem Wuchsstoff beruhte, wurde zweimal der Hafer-

krümmungstest mit den Durchleitpräparaten ausgeführt. Es traten jedoch in keinem Fall Krümmungen auf.

d) Versuche mit ganzen Haferkeimlingsspitzen. Zur Ergänzung der Untersuchungen an Koleoptilspitzen wurden noch drei Versuche ausgeführt mit *ganzen* Keimlingsspitzen, also einschließlich Primärblatt.

Für den Versuch wurden die Haferspitzen mit einer Schere abgeschnitten, schätzungsweise 1500—2000 Stück, und zur Entfernung von etwa anhaftendem Sägemehl in einem Becherglas mit Aqua bidest. gewaschen. Sie wurden auf Filtrierpapier leicht abgetrocknet und anschließend im Mörser zu einem Brei zerrieben. Durch Zentrifugieren ließ sich nur ein trüber Saft vom Sediment abtrennen, der dann mit 8 cm³ n-Butanol durchgeschüttelt wurde. Jetzt anschließendes Zentrifugieren ergab einen klaren hellgelb-grünstichigen Butanolauszug. Dieser wurde zunächst eingedampft — in zwei Fällen bis auf einen sehr geringen Flüssigkeitsrückstand, das dritte Mal bis eben zur Trockene — und dann wieder mit etwa 8 cm³ Butanol acht Stunden dunkel unter einer Glasglocke stehengelassen. Die so entstandene hellbraune Butanollösung wurde abermals abgedampft und der Rückstand mit etwa 25%igem Alkohol (einmal wurde Aqua bidest. benutzt) auf das Chromatographierpapier gebracht.

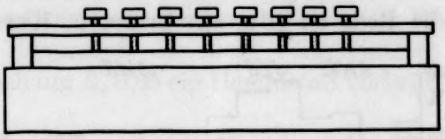


Abb. 11. „Durchleitversuch". Erläuterungen im Text

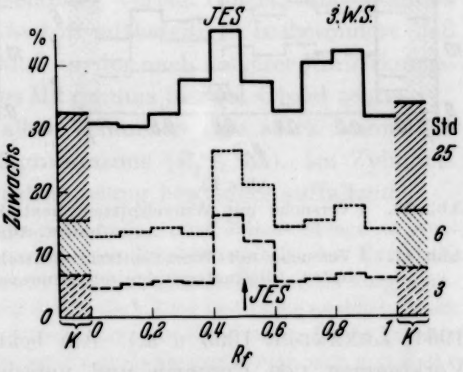


Abb. 12. 2 Versuche mit dem in Butanol aufgenommenen Saft von etwa 1500 zerriebenen, ganzen Haferkeimlingsspitzen. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

Nach Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak ließ die Wirkungskurve zwei deutliche Maxima erkennen, erstens bei etwa R_f 0,50 und zweitens bei R_f 0,80 (Abb. 12). Ersteres ist sicher auf IES zurückzuführen. Das letztere kam immer erst nach längerer Zeit, dann aber recht deutlich zum Vorschein. Sicher handelte es sich hier um den „3. Wuchsstoff" der Koleoptilspitze. Der sonst beobachtete „2. Wuchsstoff" trat in zwei Versuchen so gut wie gar nicht in Erscheinung. Der dritte Versuch ergab dagegen nach längerer Testdauer einen deutlichen Förderungszipfel, aber erst in der vierten Chromatogrammzone. Vielleicht darf man dafür den „2. Wuchsstoff" verantwortlich machen, denn auch die synthetische IES hatte in dem Versuch den ungewöhnlich hohen R_f-Wert 0,61.

Von einer hemmenden Wirkung der Chromatogrammzone am Start war bei diesen Versuchen nur sehr wenig zu merken. Eine geringfügige

Hemmung verursachte teilweise auch die Zone an der Lösungsmittelfront, obwohl das Papier vorgereinigt war.

B. Wurzelspitzen

Analog den bisherigen Versuchen mit Koleoptilspitzen wurden auch Untersuchungen an Wurzelspitzen durchgeführt, einmal zum Vergleich der Verhältnisse in Sproß und Wurzel, zum anderen, da von Hemmstoffen in Wurzeln, gerade auch Getreidewurzeln, in der Literatur des öfteren die Rede ist (BENNET-CLARK u. KEFFORD 1953, VOGT 1951, HOWELL

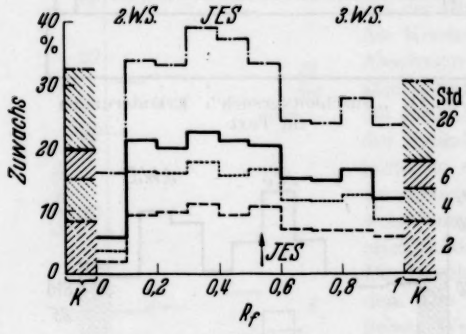


Abb. 13

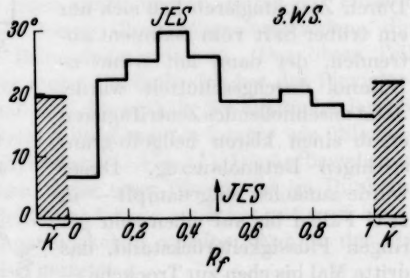


Abb. 14

Abb. 13. 4 Versuche mit Wurzelspitzenrohextrakt. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

Abb. 14. 5 Versuche mit Wurzelspitzenrohextrakt unter Anwendung des Krümmungstestes. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

1954, LEXANDER 1953 u. a.). Am bekanntesten dürfte hier wohl das Vorkommen von Cumarin und verschiedenen Derivaten davon sein (GOODWIN u. versch. Mitarbeiter, ANDREAE 1952, EBERHARD 1955).

I. Methodik

Die Anzucht des Hafers erfolgte wiederum in Sägemehl. Verwendet wurden die Pflänzchen jetzt aber in einem früheren Entwicklungsstadium, am besten, wenn die Koleoptilen eben aus dem Substrat hervorbrachen. Es waren dann durchweg drei Wurzeln von 3—4 cm Länge gebildet. Die Säuberung der ausgezupften Pflanzen erfolgte durch kräftiges Abbrausen unter der Wasserleitung in einem grobmaschigen Haarsieb. Durch Ausbreiten auf etwas festem Fließpapier wurde das Pflanzenmaterial leicht abgetrocknet. Die Wurzelspitzen wurden nun in einer Länge von knapp 4 mm abgeschnitten. Die Region der Wurzelhaare kam also nicht mit zur Verwendung. Je 300 Spitzen wurden mit 3 cm^3 Aqua bidest. ausgelaugt wie im Falle der Koleoptilspitzen. Auch die weitere Verarbeitung sowie der Test wurden in analoger Weise ausgeführt.

II. Ergebnisse

1. Chromatographie des Wurzelspitzenrohextraktes. *a) Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak.* Krümmungs- und Zylindertest ergaben in diesen Versuchen ein recht gut übereinstimmen-

des Bild der Chromatogramm-Wirkungskurve, wie aus den Abb. 13 und 14 hervorgeht, besonders, wenn man dabei berücksichtigt, daß der durchschnittliche R_f-Wert der IES-Kontrollen in den Versuchen mit Zuwachstest um 0,05 höher lag und so in die sechste anstatt in die fünfte Chromatogrammzone fiel. Beide Durchschnittskurven zeigen zwei Maxima. Das kleinere, bei etwa R_f 0,8 gelegene, ist allerdings nur ein relatives, d.h. die Kontrollen liegen gleich oder noch etwas höher. Trotzdem möchte ich annehmen, daß hier eine leichte Wuchsstoffwirkung tatsächlich vorhanden ist[1]. Das sich frontwärts anschließende Minimum ist sehr wahrscheinlich durch einen Hemmstoff des nicht vorgereinigten Papiers bedingt. Daß in dem Bereich um R_f 0,65 ein Hemmstoff vorliegt, erscheint mir zweifelhaft.

Das große, von R_f 0,1—0,5 (bzw. 0,6) reichende Maximum der Wirkungskurve dürfte in erster Linie verursacht sein durch IES, bei der vermutlich eine beachtliche „Schwanzbildung" vorlag. Höchstwahrscheinlich war jedoch noch ein zweiter Wuchsstoff mitbeteiligt. Insbesondere ließ der Zylindertest einen solchen Schluß zu, der nach längerer Einwirkungszeit eine deutliche Aufspaltung des Maximums in zwei Gipfel zeigte.

Sehr deutlich ergab sich in allen Versuchen eine stark hemmende Wirkung der untersten Chromatogrammzone ($R_f \leqq 0{,}1$). Im Zylindertest war dies bei der ersten Zuwachsmessung besonders auffallend.

In einem weiteren Versuch wurde nur die halbe sonst übliche Menge an Ausgangsmaterial genommen. Außerdem wurde hier die Auftragstelle des Extraktes vollständig von der Elution des untersten Chromatogrammabschnittes ausgenommen. Die Folge war, daß eine Hemmung durch diese Zone fast völlig ausblieb. Nach 25stündiger Testdauer zeigte sich stattdessen sogar eine Förderung. Recht gut war in diesem Versuch zu erkennen, wie das sonst nur mäßig gegliederte, sich von R_f 0,1 bis 0,6 erstreckende Maximum der Wirkungskurve in zwei Teile zerfiel. Auch hier wurde dies im Laufe längerer Zeit immer deutlicher. Eine wenig differenzierte Wirkung hatte dagegen der frontnahe Teil des Chromatogramms. Erst nach 25 Stunden war eine Wachstumsförderung zu erkennen im Bereich um R_f 0,85. Hemmwirkungen blieben dagegen in der oberen Chromatogrammzone aus (Abb. 15).

Erwähnt sei noch, daß, nachdem allgemein die Verarbeitung der Chromatogramme, d.h. das Auftragen des Extraktes und nachher das Auswaschen, am Tageslicht erfolgt war, diese Arbeiten bei einigen Versuchen im Rotlicht verrichtet wurden, um einen etwaigen Einfluß kurzwelligen Lichtes auszuschalten. Ein gesicherter Unterschied in den Ergebnissen ließ sich jedoch nicht feststellen.

b) Chromatographie mit Äthanol-Aqua bidest.-Ammoniak. Bei Verwendung dieses Lösungsmittelgemisches kamen zwei Wuchsstoffzonen

[1] Vielleicht kann man den Zuwachs der Kontrollen allgemein als etwas zu hoch ansehen. Es wurde nämlich einmal eine der üblichen „leeren Chromatogrammzonen" mit einem entsprechend großen Abschnitt unterhalb der Startlinie (die dann entsprechend höher gelegt war), der also auch vom Lösungsmittel durchtränkt war, verglichen. Es ergab sich dann für die letztgenannte Zone ein etwas geringerer Zuwachs beim Test. Es wäre daher vielleicht gut, allgemein Kontrollabschnitte unterhalb der Startlinie zu entnehmen.

deutlich zum Vorschein. Die untere von diesen war allerdings in ihrer Lage wenig konstant; die Abb. 16 stellt deshalb nur eine Kombination von zwei Wirkungskurven dar. Die R_f-Werte der synthetischen IES wichen dagegen nur wenig vom Durchschnittswert (0,68) ab, und in diesen Bereich fiel auch das obere der beiden Wuchsstoffmaxima. Es liegt also nahe, auch beim Wurzelextrakt die hier wirksame Substanz als IES anzusehen. Der zweite Wuchsstoff lag im Mittel mit seinem Gipfel in der vierten Chromatogrammzone. Trotz der hierbei auftretenden Unregelmäßigkeiten der R_f-Werte möchte ich annehmen, daß es sich stets um den gleichen wirksamen Stoff handelte. Der Zylindertest zeigte in diesem Bereich wieder eine Zunahme der Wachstumsförderung mit der Zeit. Nach zweistündiger Testdauer war kaum erst ein Anfang davon zu erkennen. Über einen nach den Isopropanolversuchen zu erwartenden dritten Wuchsstoff gab die Chromatographie mit dem Äthanolgemisch keine Auskunft.

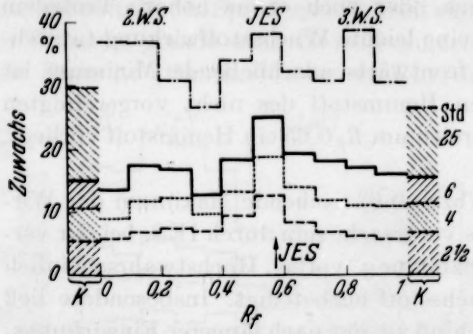


Abb. 15. Ein Versuch mit der halben sonst üblichen Menge Wurzelspitzenrohextrakt. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

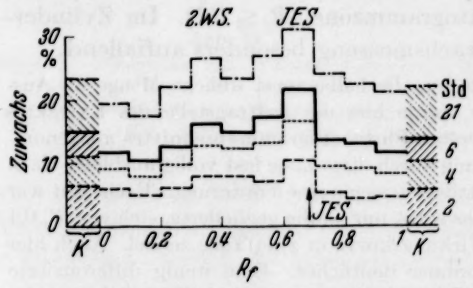


Abb. 16. 2 Versuche mit Wurzelspitzenrohextrakt. Chromatographie mit Äthanol-Aqua bidest.-Ammoniak, 70:25:5

Eine Hemmstoffwirkung ließ sich außer in der bereits gesondert betrachteten Frontzone vor allem im zweiten Chromatogrammabschnitt (R_f 0,1—0,2) erkennen. Vermutlich ist hierfür die gleiche Substanz verantwortlich zu machen, die bei Verwendung von Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak in der untersten Zone des Chromatogramms verblieb. Im Vergleich zur Kontrolle übte zwar auch beim Äthanolchromatogramm diese Zone eine Hemmung aus, besonders im Krümmungstest, doch gewöhnlich nicht in dem Maße wie der folgende Abschnitt.

c) Chromatographie mit Butanol-Aqua bidest. bzw. Butanol-aqua bidest.-Ammoniak. Das anfänglich benutzte Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Wasser erwies sich bezüglich synthetischer IES als wenig geeignet, da es keine exakten R_f-Werte ergab, sondern die mit Perchlorsäure-Eisenchlorid erzeugten Farbflecke sehr lang ausgezogen waren. Daher wurde

in weiteren Versuchen ammoniakalisch chromatographiert, wie es schon bei den Koleoptilspitzenversuchen beschrieben wurde. Der Farbfleck der synthetischen IES war dann stets sehr scharf begrenzt; der R_f-Wert lag im Durchschnitt bei 0,37. Ohne Ammoniak war die IES ein beachtliches Stück weitergewandert. Das keineswegs klar erkennbare Maximum des sehr in die Länge gezogenen Farbfleckes schwankte zwischen etwa R_f 0,40 und R_f 0,58.

Die Chromatographie mit Butanol-Aqua bidest.-Ammoniak ergab die aus Abb. 17 ersichtliche Wirkstoffverteilung. Eine starke Wachstums-

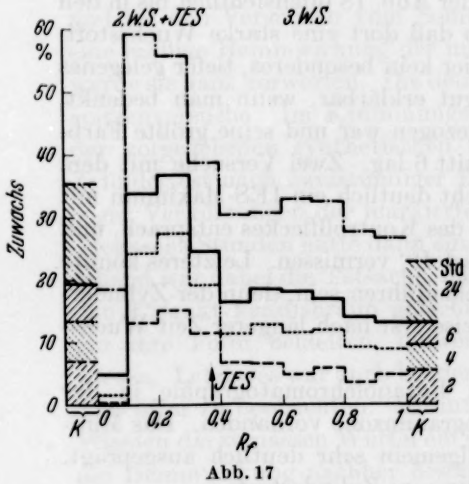


Abb. 17

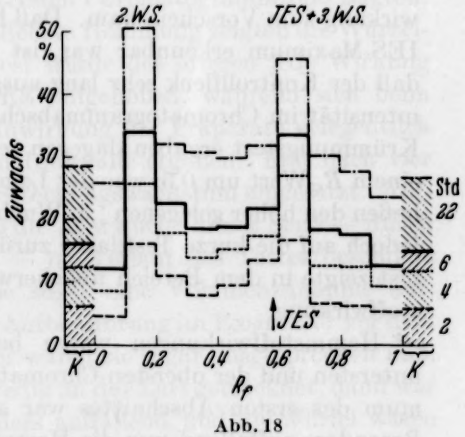


Abb. 18

Abb. 17. 2 Versuche mit Wurzelspitzenrohextrakt. Chromatographie mit n-Butanol-Aqua bidest.-Ammoniak

Abb. 18. Ein Versuch mit Wurzelspitzenrohextrakt. Chromatographie mit n-Butanol-Aqua bidest.

förderung ergab ein breiter Bereich um einen R_f-Wert von 0,2. Der Gipfel der Wirkungskurve lag dabei teils in der zweiten, teils in der dritten Zone, entsprechend einem etwas höheren oder niedrigeren R_f-Wert der IES-Kontrolle. Frontwärts erstreckte sich die Förderungszone bis etwa R_f 0,4. Ein weiteres, nur schwaches Maximum der Wirkungskurve lag im allgemeinen zwischen R_f 0,6 und 0,7, erstreckte sich teilweise aber auch noch auf den nächst höheren Chromatogrammabschnitt. Zuwachs- und Krümmungstest ergaben praktisch das gleiche Bild.

Aufschlußreich für die Ausprägung der Wachstumsmaxima mögen die eben erwähnten Versuche mit Butanol-Wasser als Chromatographierflüssigkeit sein. Während nämlich die synthetische IES hierin keinen scharfen R_f-Wert ergab, war die untere, natürliche Wuchsstoffzone beim Test recht gut abgegrenzt und beschränkt auf den zweiten Chromatogrammabschnitt (R_f 0,1—0,2). Der zweite Förderungsbereich lag zwischen

R_f 0,4 und 0,7 und schwankte entsprechend der IES-Kontrolle. Nun wäre es denkbar, daß in den zuvor genannten Versuchen die breite Ausdehnung des Wuchsstoffmaximums bei R_f 0,2 verursacht wurde durch IES, deren R_f-Wert in diesen Fällen bei 0,37 lag. Demnach wäre also ein Maximum der Kurve durch zwei verschiedene Wuchsstoffe bedingt, die nicht genügend getrennt wurden. Für das Maximum oberhalb R_f 0,6 wäre dann ein dritter Wuchsstoff verantwortlich. Bei Chromatographie ohne Ammoniak, wo die IES weiterwanderte, beeinflußte diese nicht mehr das erste Wuchsstoffmaximum, das somit schärfer begrenzt war. Stattdessen reichte sie im Fall der Abb. 18 offensichtlich bis in den Bereich des dritten Wuchsstoffes, so daß dort eine starke Wuchsstoffwirkung zum Vorschein kam. Daß hier kein besonderes, tiefer gelegenes IES-Maximum erkennbar war, ist gut erklärbar, wenn man bedenkt, daß der Kontrollfleck sehr lang ausgezogen war und seine größte Farbintensität im Chromatogrammabschnitt 6 lag. Zwei Versuche mit dem Krümmungstest ergaben dagegen recht deutlich ein IES-Maximum mit einem R_f-Wert um 0,5, was der Lage des Kontrollfleckes entsprach, und ließen den höher gelegenen „3. Wuchsstoff" vermissen. Letzteres könnte jedoch auf die kurze Testdauer zurückzuführen sein, denn der Zylindertest zeigte in dem Bereich üblicherweise erst nach längerer Zeit Wuchsstoffwirkung.

Hemmstoffwirkungen waren bei Butanolchromatographie in der untersten und der obersten Chromatogrammzone vorhanden. Das Minimum des ersten Abschnittes war allgemein sehr deutlich ausgeprägt. Besonders auffallend war die Hemmung im Zylindertest.

2. Versuche mit vorbehandeltem Extrakt. Für einige wenige Versuche wurde der Rohextrakt mit Chloroform ausgeschüttelt, ehe er der Papierchromatographie unterworfen wurde. Die Arbeitsweise war dabei die gleiche wie bei den Koleoptilversuchen. Die Ergebnisse waren im wesentlichen folgende: Aus saurer Lösung ließ sich gut der Wuchsstoff der Heteroauxinzone ausschütteln. Sein Förderungsmaximum war dann gut abgegrenzt und beschränkt auf die Chromatogrammabschnitte 3 und 4. Über die beiden anderen Wuchsstoffe war nichts Sicheres zu sagen, doch hatte es den Anschein, daß der „3. Wuchsstoff" zumindest teilweise aus alkalischer Lösung mit Chloroform ausschüttelbar ist.

Die sonst starke Wachstumshemmung durch den untersten Chromatogrammabschnitt war nach Ausschütteln mit Chloroform stets aufgehoben. Auch die bei Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak hemmstoffverdächtige Zone um R_f 0,65 zeigte sich jetzt unwirksam.

Durchleitversuche, wie sie für eine Anzahl der Koleoptilspitzenversuche beschrieben wurden, ergaben, daß weder in der 1. noch in der 7./8. Zone des Chromatogramms von Wurzelspitzenrohextrakt (Chromato-

graphie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak) ein Hemmstoff vorhanden war, der leicht einen Haferkoleoptilzylinder durchwandert.

3. Fragen und Untersuchungen bezüglich des Hemmstoffes der Chromatogrammzone am Start. Bereits bei den Koleoptilversuchen tauchten Zweifel auf, ob es sich bei der Hemmung in der Zone am Start um eine Substanz mit Wirkstoffcharakter handelte. Die Wurzelspitzenversuche ließen diese Frage erneut aufkommen, zumal da sich auch hier in keinem Fall ein Hemmstoff in Chloroform überführen ließ. Die bei den Rohextraktchromatogrammen stark mit Substanz beladene Auftragestelle wurde stets weitgehend bei der nachfolgenden Verarbeitung zurückgelassen, und bei den Versuchen vom Sommer und Herbst 1957, die auch öfter eine mäßige Hemmwirkung der untersten Chromatogrammzone zeigten, wurde sie ganz verworfen. Die deutlichste Hemmung zeigten die Wurzelspitzenversuche. Im Krümmungstest wurde des öfteren jede Wirkung der vorgegebenen synthetischen IES aufgehoben, während sich beim Zylindertest nach zweistündiger Einwirkung der Präparate gelegentlich sogar Verkürzungen der markierten Intervalle ergaben. Erst nach vier oder sechs Stunden hatte dann ein Streckungswachstum eingesetzt. Auffallend war dabei die Tatsache, daß die Agarwürfel dieser Serie — durch den Extrakt kandisbraun gefärbt — im Verlauf des Testes besonders gut ihre Form behielten, teilweise sogar eine Volumenzunahme aufwiesen. Letzteres war auch bei der Aufbewahrung im Exsiccator vor dem Test öfter zu beobachten. Mitunter waren sie sogar ausgesprochen naß. Wurden die zu nassen Würfel ein wenig an der Luft getrocknet, dann war die Hemmwirkung nachher besonders auffallend, und die Würfel waren wieder naß. Es drängte sich also die Vermutung auf, daß die Agarwürfel den Testzylindern osmotisch Wasser entzögen.

Auch die mit dem Wannentest erhaltenen Ergebnisse stützen diese Annahme. Da hier die Testsubstanz in stärkerer Verdünnung in wäßriger Lösung vorlag, war die osmotische Wirksamkeit — und entsprechend auch die beobachtete Hemmwirkung — zunächst gering. Im Verlaufe des Testes trat dann wahrscheinlich eine Erhöhung der Lösungskonzentration ein, da das Wasser vermutlich schneller von den Zylindern aufgenommen wurde als die gelösten Stoffe. Die Hemmstoffwirkung trat dementsprechend erst nach längerer Testdauer stärker in Erscheinung.

Wegen der sirupartigen Konsistenz des eingedampften Rohextraktes lag es nahe, Zucker als osmotisch hemmend wirkende Substanz anzusehen. Es wurden deshalb Untersuchungen angestellt, ob und in welcher Konzentration Traubenzucker eine ähnliche Hemmwirkung entfalten kann. Zunächst wurde eine sehr hohe, nicht genau bekannte Konzentration im Zylindertest ausprobiert. Der Erfolg war tatsächlich eine starke Wachstumshemmung, die selbst nach 22 Stunden noch nicht restlos

überwunden war. Das gleiche Ergebnis lieferte auch der Krümmungstest. Von zwei verschiedenen Glucose-Konzentrationen übte die höhere die stärkere Hemmwirkung aus. In weiteren Experimenten wurde dann versucht, die Grenzkonzentration für eine Hemmung zu ermitteln. Im Zylindertest verminderte 4%iger Glucoseagar das Wachstum noch nicht. Im Krümmungstest wirkten selbst 8—12% Glucosegehalt noch fördernd. Das ist aber bereits mehr als der in der betreffenden Chromatogrammzone verbliebenen Gesamtsubstanz entspricht, wie durch Wägen dieses Abschnittes vor und nach dem Eluieren festgestellt wurde. Außerdem wurde ein Chromatogramm von Wurzelspitzenrohextrakt mit p-Anisidin-Lösung als Zuckerreagens (MUKHERJEE u. SRIVASTAVA 1952) besprüht. Es zeigte sich dann, daß bei der Menge der Ausgangssubstanz zwar Zucker am Start und in der folgenden Zone verblieben, daß aber der größere Teil beim Chromatographieren mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak einen wohlbegrenzten Fleck bildete mit einem R_f-Wert von etwa 0,44. Zucker konnten also nicht die fragliche Hemmung verursachen, jedenfalls nicht allein.

Eine weitere Stoffklasse, die für eine Hemmung auf Grund osmotischer Wirkung in Betracht kam, waren Salze. Es wurden daher Versuche mit verschieden hohen Zusätzen von NaCl zum Agar angestellt. Dabei zeigte ein Kochsalzgehalt der Würfel von 1,5% bereits eine beachtliche Hemmwirkung, teilweise sogar schon ein solcher von 1%. Beide Testmethoden reagierten hier in gleicher Weise. Eine solche Salzmenge könnte größenordnungsmäßig aber schon mit der im Chromatogrammabschnitt enthaltenen Substanz vergleichbar sein.

Nach diesen Vorversuchen ergab sich die Frage nach dem Verbleib der Hauptmenge der in dem Pflanzenextrakt vorhandenen Salze auf dem Chromatogramm. Zur Sichtbarmachung auf dem Papier wurde ein Verfahren benutzt, das CRAMER (1954) angibt für eine Anfärbung von Alkali- und Erdalkalisalzen, die hier wohl in erster Linie in Betracht zu ziehen waren. Besprühen des Papiers mit 0,1-molarer, wäßriger Violursäure und anschließendes Trocknen bei 60° ergibt an der Stelle der genannten Metallionen gelbliche bis violettrötliche Farbflecke.

Es wurden zunächst verschiedene Salze (NaCl; KCl; $CaCl_2$) mit den genannten Lösungsmitteln chromatographiert. Die R_f-Werte von K^+ und Na^+ lagen dann so, daß sie etwa in die fragliche Hemmstoffzone fielen, vor allem bei Verwendung von Isopropanol und Butanol (Ca^{++} wanderte etwas weiter). Im letzteren Lösungsmittel erfolgte nur eine geringfügige allseitige Ausbreitung vom Start aus. In Isopropanol fand eine deutliche, wenn auch geringe Wanderung statt, die in Äthanol noch beträchtlich stärker war.

Durch Besprühen mit Violursäure wurden dann auch von Koleoptil- und Wurzelspitzen *Rohextraktchromatogramme* im Hinblick auf Leicht-

metallionen untersucht. Die dabei sich ergebenden Farbflecke hatten etwas kleinere R_f-Werte als im Falle der reinen Salzchromatographie, besonders im Äthanolgemisch; doch war jetzt die Übereinstimmung mit der Hemmstoffzone noch etwas besser. Ganz besonders wurde durch die Chromatographie mit Butanol die Vermutung der osmotischen Hemmung durch Salze gestützt.

Zusammengefaßt ergibt sich also, daß die Hemmung in der Nähe der Startzone wenigstens zu einem erheblichen Teil auf der osmotischen Wirkung von Alkali- oder Erdalkalisalzen des Extraktes beruht.

Besprechung der Haferkeimlingsversuche

Die geschilderten Untersuchungen lassen erkennen, daß neben der Indolylessigsäure im Haferkeimling, sowohl in der Koleoptil- als auch in der Wurzelspitze, zwei weitere, das Streckungswachstum fördernde Stoffe vorhanden sind, im Gegensatz zu der Anschauung von TERPSTRA (1953), wonach stets nur IES nachweisbar ist. RAADTS u. SÖDING (1957) fanden neben diesem einen, aktiven Wuchsstoff einen weiteren, ihrer Meinung nach jedoch inaktiven Stoff. Für diese Annahme sprechen auch die hier geschilderten Untersuchungen, denen zufolge die Wirksamkeit der beiden „neuen Wuchsstoffe" beim Zylindertest mit der Zeit zunahm. Aktivierungsversuche durch irgendwelche Behandlungen wurden jedoch nicht vorgenommen. Möglichst natürliche Verhältnisse sollten auch dadurch erhaltenbleiben, daß die *Rohextrakte* der Papierchromatographie unterworfen wurden. Wie leicht hier u. U. Veränderungen durch den Aufarbeitungsvorgang eintreten können, bringen HOUSLEY u. BENTLEY (1956) klar zum Ausdruck. Nach ihren Angaben bietet schon die ammoniakalische Chromatographie bedeutsame Umwandlungsmöglichkeiten.

Ein unbeantwortetes Problem bleibt es nach den bisherigen Versuchen, weshalb oftmals von den drei Wuchsstoffen einer nicht nachweisbar war (ausgenommen IES). Zu vermuten ist nach diesem Verhalten, daß es sich bei dem „2. und 3. Wuchsstoff" um Substanzen handelt, die erst unter im einzelnen noch nicht bekannten, jeweils offenbar verschiedenen Bedingungen wirksam werden. So ist es vielleicht auch zu erklären, daß RAADTS u. SÖDING bei Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak den „3. Wuchsstoff" nicht erkannten. Dagegen möchte ich annehmen, daß in deren Butanolchromatogrammen ihr „2. Wuchsstoff", dessen R_f-Wert dort etwa mit 0,7 angegeben wird, mit meinem „3. Wuchsstoff" gleichzusetzen ist, und daß der, nach meiner Benennung, „2. Wuchsstoff" auch dort mit im IES-Gipfel wirksam ist. Dieser Schluß scheint mir besonders nahezuliegen bei den Säurebehandlungsversuchen von RAADTS u. SÖDING, wo die Hauptwuchsstoffwirkung deutlich bei einem niedrigeren R_f-Wert liegt als der Farbeffekt der

synthetischen IES auf dem Kontrollstreifen. Auch in meinen Versuchen wurde letztere Beobachtung des öfteren gemacht.

Über die chemische Natur des „2. und 3. Wuchsstoffes" lassen sich auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nur Vermutungen anstellen. Die wenigen Ausschüttelversuche mit Chloroform lassen eher einen Schluß auf neutrale als auf saure Substanzen zu. Für den „3. Wuchsstoff" würde das recht gut übereinstimmen mit den Ergebnissen von RAADTS u. SÖDING bei Chromatographie mit Butanol, während nach deren Untersuchungen dem „2. Wuchsstoff" (Chromatographie mit Isopropanol) eher Säurenatur zukäme. Zieht man das Verhalten bei Chromatographie mit und ohne Ammoniakzusatz zum Lösungsmittel in Betracht, so bestand hier im Falle des „3. Wuchsstoffes" praktisch kein Unterschied in den R_f-Werten (0,8—0,85). Es wäre hier demnach eine neutrale Verbindung zu vermuten. Der „2. Wuchsstoff" lief dagegen ohne Ammoniak etwas schneller, was u. U. auf Säurenatur hindeutet.

Vergleicht man die Ergebnisse der Wurzelversuche mit denen der Koleoptilspitzenuntersuchungen, so erscheint es ziemlich sicher, daß IES und „2. Wuchsstoff"[1] in beiden Organen gleichermaßen vorkommen. IES ist in den vergangenen Jahren wiederholt in Wurzeln verschiedener Pflanzen mit Hilfe der Papierchromatographie gefunden worden (LEXANDER 1953; BENNET-CLARK u. KEFFORD 1953; BRITTON, HOUSLEY u. BENTLEY 1956). Andererseits soll jedoch nach neueren Untersuchungen von HOUSLEY, BOOTH u. PHILLIPS (1956) die Maiswurzel keine IES enthalten, wohl aber die Koleoptile.

Die erstgenannten Autoren erhielten alle noch mindestens einen zweiten, meist aus saurer Lösung mit Äther ausschüttelbaren Wuchsstoff. Am besten vergleichbar sind meinen Versuchen wohl die von LEXANDER mit Weizen- oder die von BENNET-CLARK u. KEFFORD mit Maiswurzeln. BENNET-CLARK u. KEFFORD fanden mit Isopropanol-Wasser-Ammoniak für diesen, von ihnen als „accelerator α" bezeichneten Stoff einen R_f-Wert um 0,1. Eine Identität dieses Stoffes mit meinem „2. Wuchsstoff" ist auf Grund der etwas verschieden zusammengesetzten Lösungsmittel vielleicht nicht ausgeschlossen. LEXANDER erhielt bei Chromatographie mit Butanol-Wasser-Ammoniak für ihren zweiten Wuchsstoff einen R_f-Wert unter 0,1. Ob damit meine Ergebnisse zu vergleichen sind, erscheint mir fraglich. Zwar könnte man an eine

[1] Gewisse Bedenken treten hier allerdings auf beim Vergleich der R_f-Werte im Äthanol-Aqua bidest.-Ammoniak. Eigene Versuchsergebnisse über Koleoptilspitzen liegen allerdings nicht vor, doch geben RAADTS u. SÖDING (1957) für ihren „2. Koleoptilenwuchsstoff", der offenbar mit dem in meinen Versuchen beobachteten „2. Wuchsstoff" der Koleoptile identisch ist, einen R_f-Wert um 0,2 (mit starken Schwankungen) an. Der R_f-Wert des „2. Wuchsstoffes" der Wurzelspitze lag dagegen bei etwa 0,35, schwankte aber auch sehr.

Verdeckung des Wuchsstoffes durch den Hemmstoff in meinen Versuchen denken. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, daß nach Ausschütteln mit Chloroform aus saurer Lösung zwar die Hemmung verschwunden, von einer Wachstumsförderung aber auch kaum eine Andeutung vorhanden war. Die beste Übereinstimmung im R_f-Wert zeigt mein „2. Wuchsstoff" mit dem „Wuchsstoff X", den BRITTON, HOUSLEY u. BENTLEY bei Chromatographie mit ammoniakalischer Butanollösung in Tomatenwurzeln fanden; doch fiel bei diesen Autoren bereits die IES in diese Chromatogrammzone. Bei mir hatte dagegen die IES-Kontrolle einen R_f-Wert von 0,33.

Der „3. Wuchsstoff" der Haferwurzel stimmt bei Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak etwa im R_f-Wert mit dem „3. Wuchsstoff" der Koleoptile überein (um 0,8). In Butanol-Aqua bidest.-Ammoniak wandern beide offensichtlich etwas langsamer, zeigen darin aber auch ein durchaus ähnliches Verhalten, so daß eine Identität gut möglich ist.

Abweichend von den Ergebnissen LEXANDERs konnte der von ihr gefundene Hemmstoff, der in Butanol-Wasser-Ammoniak einen R_f-Wert von 0,60—0,75 hat und aus saurer Lösung mit Äther ausgeschüttelt werden kann, in der Haferwurzelspitze nicht festgestellt werden. Andererseits fand aber auch LUCKWILL (1952) in zahlreichen Pflanzen verschiedenster Art einen Hemmstoff mit dem gleichen R_f-Wert. BENNET-CLARK u. KEFFORD erhielten bei ihren Untersuchungen — u. a. an Maiswurzeln — gleichfalls einen Hemmstoff, der in Isopropanol-Wasser-Ammoniak einen R_f-Wert um 0,65 hatte und auch aus saurer Lösung ausschüttelbar sein soll. Demgegenüber war diese Zone des Chromatogramms in meinen Versuchen höchstens schwach hemmend wirksam, wenn der Rohextrakt benutzt wurde. Eine mögliche Erklärung für das abweichende Ergebnis meiner Versuche ist die, daß der Hemmstoff bei Haferwurzeln in der äußersten Spitze fehlt, wie dies EBERHARD (1955) z. B. für gewisse fluorescierende Substanzen feststellte.

Nicht zu erkennen war der „3. Wuchsstoff" bei der Chromatographie mit Äthanol. Sollte er in diesem Lösungsmittel einen ähnlichen R_f-Wert haben wie in dem zuvor genannten, so wurde er wahrscheinlich von der IES verdeckt.

Beachtenswert erscheinen mir die Versuche mit den ganzen Keimlingsspitzen. Offenbar lagen hier kaum grundsätzlich andere Verhältnisse vor als bei Benutzung allein der Koleoptilspitzen. Eine Unsicherheit im Auftreten des „2. Wuchsstoffes" war bei beiden Verfahren in gleicher Weise feststellbar. Im übrigen bietet diese Versuchsanordnung durchaus die Möglichkeit, größere Mengen von Ausgangsmaterial zu verarbeiten, so daß auf diese Weise vielleicht manche Frage zu klären ist.

Eine ungelöste Frage bleibt nach allen vorliegenden Untersuchungen die Hemmstoffwirkung der Startzone bei Rohextraktchromatographie. Die Chromatographie reiner Salze legte den Gedanken an eine Wachstumshemmung durch Ionen nahe. — Auch TEGETHOFF (1950) erwähnt übrigens diese Möglichkeit. — Die bei Benutzung von Äthanol noch beachtlich über die Haupthemmungszone des Chromatogramms hinaus beförderte Ionenmenge könnte durch dort schon vorhandene „Wuchsstoffschwänze" in ihrer hemmenden Wirkung kompensiert werden. Ob aber die Hemmung als eine ausschließliche Ionenwirkung angesehen werden kann, erscheint mir zweifelhaft auf Grund der Extraktionsversuche mit Alkohol (Abb. 9, 10). Es ist wohl fraglich, ob die dabei beobachtete, wenn auch meist nicht sehr starke Hemmwirkung darauf beruhte, daß durch den geringen Wassergehalt des Alkohols (96%ig) genügend viel Salzionen aus dem zur Trockene eingedampften Rückstand gelöst wurden.

Offen bleibt auch die Frage, wie die im Durchschnitt von 13 Versuchen zu verzeichnende Hemmwirkung des Chromatogrammabschnittes 9 (R_f 0,8—0,9) bei Chromatographie mit Isopropanol-Wasser-Ammoniak zu beurteilen ist. Obgleich die Wirkung nur gering war, dürfte die Zahl der Versuche doch wohl für das Vorhandensein eines Hemmstoffes sprechen. Bemerkenswerterweise war dieser bei den neueren Versuchen nicht oder ausnahmsweise nur im Anfang festzustellen, während später an seiner Stelle der „3. Wuchsstoff" erschien. Man könnte die Erscheinung auf zweierlei Weise deuten, erstens durch die Annahme, daß hier zwei gegensätzlich wirkende Substanzen vorlagen, von denen sich auf die Dauer der Wuchsstoff durchsetzte, oder zweitens durch die Möglichkeit einer Umwandlung während der Testzeit. Um eine Frage der Konzentration scheint es sich nicht zu handeln, denn in einem Versuch mit weniger als zwei Dritteln des üblichen Ausgangsmaterials war die Hemmung auch durchaus deutlich. Im übrigen deutet auch eine im 10. Chromatogrammabschnitt gelegentlich verstärkt oder bei vorgereinigtem Chromatographierpapier auftretende Hemmwirkung auf einen Hemmstoff hin. Jedenfalls darf man die Möglichkeit, daß hier ein Hemmstoff des Pflanzenextraktes auftreten könnte, sicher nicht außer acht lassen. Vielleicht ist auch in dem ungleich alten Saatgut ein Faktor für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse zu suchen. Der benutzte Hafer stammte vorwiegend aus der Ernte von 1954, war also für die erste Versuchsserie knapp ein Jahr alt oder weniger, während in den neueren Versuchen das Saatgut zwei Jahre alt war.

Mais-Scutellum

Die Theorie von der Inaktivierung des aus dem Endosperm des Getreidekorns aufsteigenden Wuchsstoffes im Scutellum veranlaßte mich,

auch Scutellumextrakte papierchromatographisch zu untersuchen. Die ersten Beobachtungen über „den" Scutellumhemmstoff machte Voss (1937, 1939) beim Mais. Aus zermahlenen ganzen Maiskörnern konnte LARSEN (1939) ebenfalls Hemmstoff extrahieren[1]. Später wurde auch von anderen Autoren der Scutellumhemmstoff wiederholt bestätigt (FUNKE 1943; POHL u. TEGETHOFF 1949; TEGETHOFF 1951; POHL 1951; BRAMESFELD 1955). Durchweg wird ihm eine Fähigkeit zur Wuchsstoffinaktivierung zugeschrieben. Von besonderem Interesse für mich war der vielbeschriebene Hemmstoff des Maisscutellums im Vergleich zu den fraglich gebliebenen Hemmstoffen des Hafers. In Anlehnung an die genannten Autoren, nach deren übereinstimmenden Angaben der Scutellumhemmstoff am besten in Äthanol löslich sein soll, wurde auch in der vorliegenden Arbeit fast ausschließlich dieser Alkohol zum Extrahieren benutzt. Daneben kamen in einigen Fällen wäßrige Auszüge zur Untersuchung. Drei verschiedene Maissorten — *Marano-Mais* (Italien), *Hybrid-Mais* (USA) und *Gelber badischer Landmais* — wurden geprüft, da nach den Untersuchungen von FUNKE mit einer Verschiedenheit im Verhalten der einzelnen Sorten gerechnet werden muß.

I. Methodik

Die Maiskörner wurden im allgemeinen zwei Tage in Leitungswasser in Petrischalen eingequollen, wobei sie bei + 4° im Kühlschrank standen. Die Scutellen wurden dann herauspräpariert, sorgfältig von anhaftendem Endosperm befreit und nach Entfernung des Embryos im Mörser zerrieben. Dem in ein Porzellanschälchen übergeführten Scutellumbrei wurden einige cm³ 96%iger Alkohol zugesetzt, womit er im Kühlschrank zur Extraktion stehenblieb, bedeckt mit einer Petrischale. Die Menge Alkohol wurde so bemessen, daß auf etwa 100 mg trockenen Extraktionsrückstand (d.h. also eine bestimmte Anzahl Körner) 1 cm³ kam. Die drei Maissorten waren recht unterschiedlich nicht nur in der Korngröße, sondern auch in der relativen Scutellumgröße und der Extraktbeschaffenheit.

Nach zwei Stunden wurde der Alkoholauszug vom Reibsel abgegossen, zusammen mit einigen Tropfen zum Nachwaschen benutzten Alkohol durch Zentrifugieren geklärt und der je nach Sorte schwächer oder intensiver gelbe, klare Extrakt auf dem Wasserbad eingedampft. Da der Scutellumhemmstoff sehr hitzebeständig sein soll (Voss 1939), konnte dies ohne Bedenken geschehen. Der alkoholische Rohextrakt war sehr fettreich, besonders der von Marano-Mais. Für die papierchromatographische Aufarbeitung schien daher eine vorherige Entfettung angebracht. Nach TEGETHOFF (1951) und auch BRAMESFELD (1955) sollen beim Ausschütteln des Extraktes mit Petroläther bzw. Aceton oder Äther, die Wirkstoffe nicht mit in diese Lösungsmittel übergehen. So wurde auch in meinen Versuchen eine Entfettung des Alkoholextraktes mit Petroläther vorgenommen. Dabei wurde so verfahren, daß der alkoholische Scutellumauszug zunächst in einem Reagensglas im Wasserbad bis eben zur Trockene eingedampft wurde. Zu dem Rückstand wurden einige cm³ Petroläther gegeben und nach wenigen Minuten Einwirkungszeit etwa 2—3 cm³ Aqua bidest., worin sich der verbliebene Bodensatz löste. Die im Scheidetrichter abgetrennte wäßrige Lösung wurde nun für den Versuch benutzt.

[1] Erschlossen wurde das Vorkommen von Hemmstoff in Maiskörnern auch von GOODWIN (1939) und nach LARSENS Angaben ebenfalls von BOYSEN JENSEN (1939).

II. Versuchsergebnisse

1. Versuche ohne Anwendung der Papierchromatographie. Allgemein zeigte sich, daß der entfettete Alkoholextrakt wachstumsfördernd wirkt. Eine Hemmstoffwirkung war dagegen mit dem üblicherweise angewandten Zylindertest praktisch nicht nachweisbar. Die Petrolätherphase wirkte nur ganz schwach wachstumsfördernd. Die Testzylinder, die nach FUNKE frisch geschnitten sein müssen, um Hemmstoff nachzuweisen — 20 Stunden alte Zylinder sollen kaum noch darauf reagieren —, waren bei mir nach dem Agaraufkleben eine halbe bis zwei Stunden alt. Dieser Altersunterschied schien für die Reaktion belanglos zu sein. Unmittelbar vorher geschnittene Zylinder wuchsen während der ersten drei Stunden außerordentlich schlecht, so daß Hemmstoffwirkungen daran schwierig festzustellen waren.

Noch stärker fördernde Wirkung als der alkoholische Auszug zeigte ein wäßriger Extrakt.

FUNKE (1943), die die gleiche Beobachtung machte, zerstörte in solchen Versuchen den in Wasser leichter löslichen Wuchsstoff durch einstündige Einwirkung von Perhydrol (= 30%iges H_2O_2). Der Hemmstoff soll H_2O_2-unempfindlich sein. Die von ihr angegebene Menge Peroxyd erwies sich in meinen Versuchen allerdings als zu gering. Bei Anwendung von mehr Perhydrol, das anschließend stets sorgfältig abgedampft wurde — gewöhnlich unter mehrmaligem Wiederaufnehmen des trockenen Rückstandes mit etwas Aqua bidest., kam es dann meist zu einer dauernden Hemmstoffwirkung. In mehreren Fällen schlug eine anfängliche Wachstumshemmung jedoch in eine spätere Förderung um.

Eine entsprechende Peroxydbehandlung wurde nun auch mit den Alkoholextrakten vorgenommen. Auch hier resultierte schließlich eine dauernde oder eine in eine Förderung umschlagende Hemmung.

Um die Wirkung trotz aller Sorgfalt beim Abdampfen etwa im Extrakt zurückgebliebenen Wasserstoffperoxyds zu prüfen, wurde zum Vergleich einmal eine mit etwas H_2O_2 versetzte Serie von Agarwürfeln getestet. Das Ergebnis war eine durchaus deutliche Hemmung, die aber doch keineswegs so stark war wie in den meisten Versuchen mit perhydrolbehandeltem Scutellumextrakt.

Die zur Anwendung kommenden Extraktkonzentrationen waren meist erheblich höher, als es FUNKE angibt. Im Durchschnitt kam bei den Rohextraktversuchen etwa ein Scutellum auf einen Agarwürfel (1 Scutellum lieferte je nach Sorte etwa 15—30 mg trockenen Rückstand). Überoptimal waren sie aber sicher nicht; denn in mehreren Versuchen ergab, wenn Vergleiche vorhanden waren, die höhere Extraktkonzentration die stärkere Wirkung, sei es als Förderung oder Hemmung. Schließlich benutzte Voss offenbar noch wesentlich stärkere Konzentrationen.

2. Papierchromatographische Untersuchung des alkoholischen Scutellumextraktes. Für alle Versuche wurde zwei Tage vorgereinigtes Papier der Sorte Schleicher u. Schüll 2043b mgl. benutzt. Das Auftragen des entfetteten Extraktes

erfolgte mit wenig Aqua bidest., meist nicht ganz quantitativ, d.h. der am Boden des Abdampfschälchens fester haftende Teil wurde im allgemeinen nicht losgekratzt. Auf die durch ein Fenster abgetrennte IES-Kontrollbahn wurde stets auch etwas Extrakt gegeben, um eine dadurch etwa bewirkte R_f-Wert-Beeinflussung der IES nicht allein auf den zu testenden Extraktstreifen bei der natürlichen Substanz zu haben. Gewöhnlich stimmten dann auch das IES-Maximum beim Test und der Farbfleck der synthetischen Substanz in ihren R_f-Werten recht gut überein. Chromatographiert wurde mit Isopropanol-Aqua bidest., 80:20, und daneben mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak (25%ig), 80:15:5. Die biologische Untersuchung der Chromatogramme wurde ausschließlich in Form des Zylindertestes nach Funke u. Söding vorgenommen. Die Zuwachsmessungen erfolgten drei, sechs und etwa 24 Stunden nach dem Aufkleben der Agarwürfel auf die Koleoptilzylinder. Oft wurde auch nach zwei oder drei Tagen nochmals abgelesen.

a) Chromatographie ohne vorherige Behandlung der Extrakte mit Perhydrol. Alle drei verwendeten Maissorten ergaben ein ziemlich gut übereinstimmendes Bild der Wirkungskurve des Chromatogramms. Die Menge des Ausgangsmaterials war bei diesen Versuchen so gehalten, daß der trockene Extraktionsrückstand 500—750 mg betrug; geringe Konzentrationsänderungen spielten in dem Bereich offenbar keine wesentliche Rolle.

Außer IES (= W.S. I), die sich in allen Versuchen nachweisen ließ, waren drei weitere, das Streckungswachstum der Haferkoleoptile fördernde Stoffe erkennbar. Sie mögen bezeichnet werden als W. S. II, W. S. III, und W. S. IV, wobei die Nummerierung etwa der Stärke der Wuchsstoffmaxima entspricht. IES entfaltete stets von Beginn des Testes an Wuchsstoffwirksamkeit, während die übrigen Gipfel öfter erst allmählich hervortraten. Beide Lösungsmittelgemische ließen diese Aufgliederung erkennen. Lediglich der Badische Landmais ließ bei ammoniakalischer Chromatographie den am schwächsten wirksamen W.S. IV vermissen. Die R_f-Werte der drei unbekannten Wuchsstoffe stimmten in beiden Lösungsmittelgemischen praktisch überein. Sie betrugen für W.S. IV etwa 0,15 (2. Chromatogrammzone), für W. S. II etwa 0,40, wobei meist die Hauptwirkung im 4. Chromatogrammabschnitt lag, und für W.S. III um 0,75. Die synthetische IES hatte bei ammoniakalischer Chromatographie einen durchschnittlichen R_f-Wert von 0,45; bei Chromatographie mit Isopropanol-Wasser schwankte er sehr und lag im Mittel bei etwa 0,70. Der Wirkungsbereich der IES fiel demnach mit jeweils einem der anderen Wuchsstoffe zusammen. Jedenfalls gingen ihre Bereiche ohne Trennung ineinander über.

Sehr bemerkenswert an den Wirkungskurven der Chromatogramme war das Fehlen einer ausgesprochenen Hemmstoffzone. Lediglich der Badische Landmais zeigte schwache Wachstumsminima an der Stelle der Chromatogrammzonen 2 und 10 im Falle der ammoniakalischen Chromatographie oder einmal auch in den Zonen 3 und 9 bei Chromatographie ohne Ammoniak. Von einer deutlichen Hemmung, wie sie von

„dem bekannten Scutellumhemmstoff" zu erwarten sein dürfte, war hier aber sicher nicht zu sprechen.

Die Abb. 19—22 stellen die Wirkungskurven der drei Maissorten dar. Bei Hybrid- und Marano-Mais wurde nur ammoniakalisch chromatographiert. Die Marano-Maiskurve zeigt bei dieser Kombination keine Trennung zwischen dem Maximum von IES und W. S. II einerseits und W. S. III andererseits. Auch in den Einzelversuchen war die Gliederung nicht so gut wie bei den beiden anderen Sorten; trotzdem wurde sie gelegentlich deutlich, was jedoch bei der in diesen Versuchen unterschiedlichen Lage des Maximums von W. S. III in der Durchschnittskurve nicht zum Ausdruck kommt.

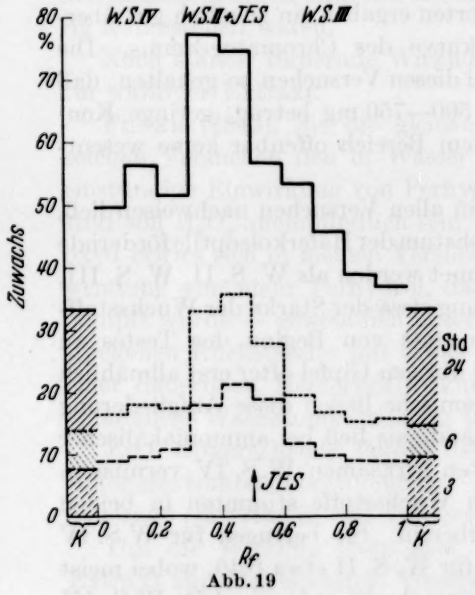


Abb. 19

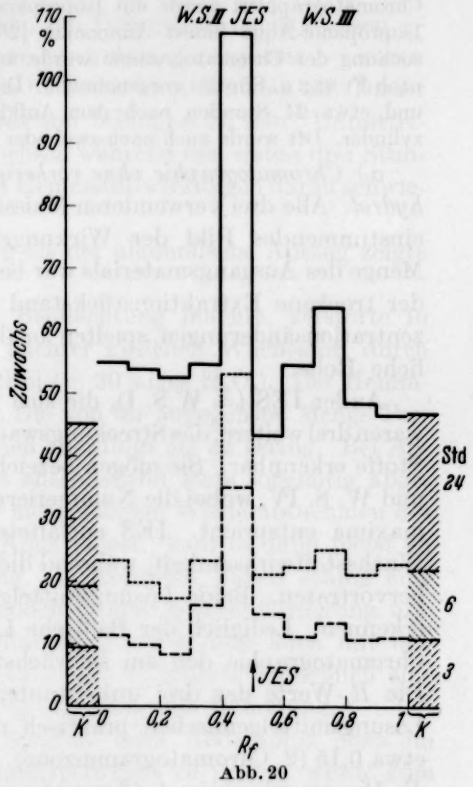


Abb. 20

Abb. 19. 4 Versuche mit entfettetem, alkoholischem Extrakt aus Marano-Mais. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

Abb. 20. Ein Versuch mit Hybrid-Mais. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

b) Chromatographie nach voraufgegangener Perhydrolbehandlung des Extraktes. Es wurden nur Hybrid- und Badischer Landmais untersucht, nicht aber Marano-Mais. Die zugegebene Menge Perhydrol wurde gewöhnlich so bemessen, daß nach Extraktion mit 1 cm³ Alkohol 0,10 bis 0,15 cm³ Perhydrol zur Anwendung kamen.

α) Versuche mit Hybrid-Mais. Der mit Wasserstoffsuperoxyd behandelte Extrakt von 20—25 Scutellen[1] zeigte nach Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest. (ammoniakalisch wurde nicht chromatographiert) bei der ersten Testablesung, d. h. nach dreistündiger Einwirkung auf die Testpflanzen, einen ziemlich ausgeglichenen Verlauf der Wirkungskurve (Abb. 23). Die IES war offensichtlich zerstört; auch nach längerer Zeit gab es an der betreffenden Stelle des Chromatogramms, die übrigens mit R_f 0,55 ungewöhnlich tief lag, keine Wachstumsförde-

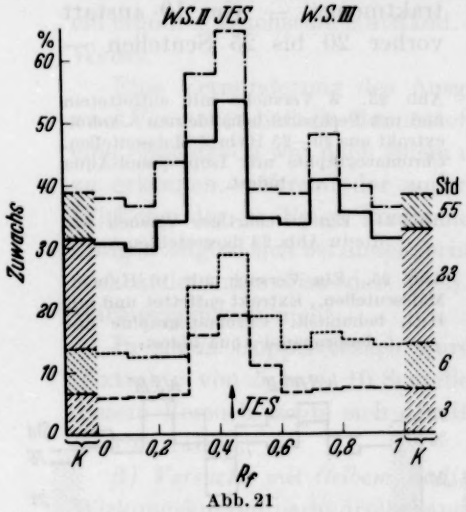


Abb. 21

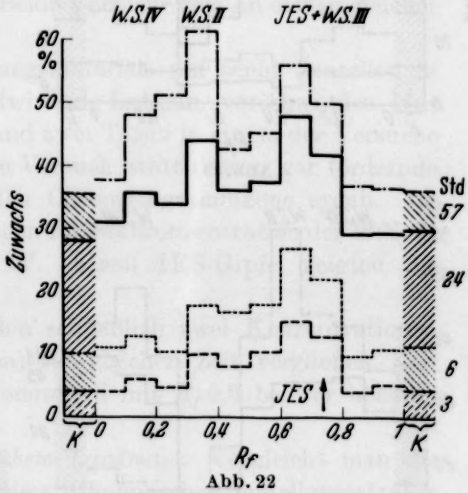


Abb. 22

Abb. 21. 2 Versuche mit Gelbem Badischem Landmais. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

Abb. 22. 2 Versuche mit Gelbem Badischem Landmais. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest. 80:20

rung. Kaum noch erkennbar war im Durchschnitt auch der W.S. III (R_f 0,7—0,8). Nur eine schwachfördernde Wirkung hatte der noch mehr frontwärts gelegene Teil des Chromatogramms. Ein Versuch (Abb. 24) zeigte dieses Maximum jedoch zuletzt sehr deutlich. Der W.S. II trat am Anfang entweder gar nicht in Erscheinung, oder es zeigte sich an seiner Stelle eine leicht hemmende Wirkung. Nach ein bis zwei Tagen war jedoch stets eine Wachstumsförderung zu verzeichnen, in manchen Fällen von beachtlicher Stärke. Ebenfalls erst nach längerer Zeit zeigte sich, wenngleich nur in schwachem Maße, der W.S. IV.

Ein wesentlicher Unterschied gegenüber den früheren Versuchen bestand darin, daß bei dem perhydrolbehandelten Extrakt ein starker Hemmstoff auftrat in dem R_f-Bereich um 0,6. Gewöhnlich handelte es sich um den siebenten, gelegentlich aber auch um den sechsten Abschnitt

[1] Der trockene Extraktionsrückstand betrug dabei 500—600 mg.

des Chromatogramms. Bei der ersten Ablesung war diese Hemmung nur sehr schwach vorhanden, um so deutlicher aber nach längerer Testdauer.

Gegenüber der Kontrolle war, besonders bei der Messung nach sechs Stunden, bei den Testserien 1 bis 6 meist ein herabgesetztes Wachstum zu verzeichnen. Hier eine spezifische Hemmstoffwirkung anzunehmen, erscheint mir jedoch nicht gerechtfertigt.

Bei Durchführung der Versuche mit einer geringeren Extraktmenge — von 10 anstatt vorher 20 bis 25 Scutellen —

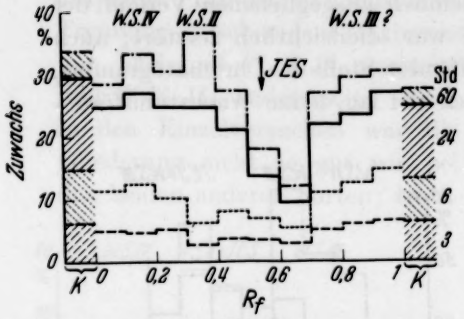


Abb. 23

Abb. 23. 3 Versuche mit entfettetem und mit Perhydrol behandeltem Alkoholextrakt aus 20—25 Hybrid-Maisscutellen. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.

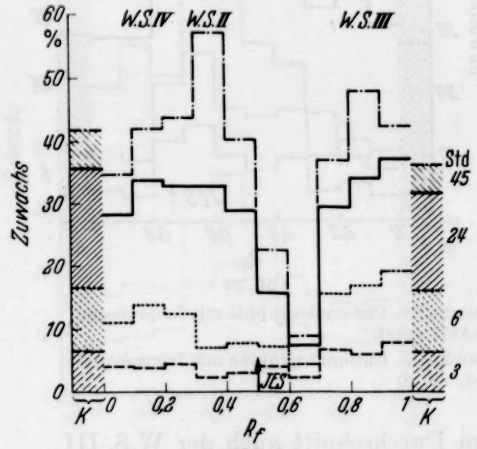


Abb. 24

Abb. 24. Ein gleichartiger Versuch wie die in Abb. 23 dargestellten

Abb. 25. Ein Versuch mit 10 Hybrid-Maisscutellen. Extrakt entfettet und mit H_2O_2 behandelt. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.

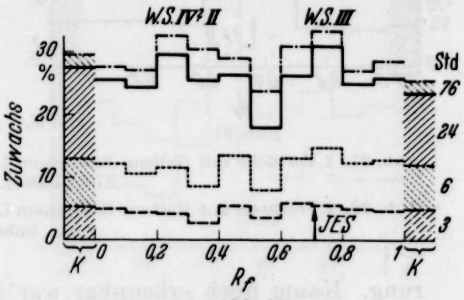


Abb. 25

ergab sich hinsichtlich der Wuchsstoffverhältnisse kein wesentlich verändertes Bild. Perhydrol wurde dabei absolut zwar weniger angewandt, relativ jedoch etwas mehr. Die Abb. 25 zeigt einen solchen Versuch, bei dem allerdings der W.S. II nur schwach in Erscheinung tritt. Die IES ($R_f = 0{,}71$) wurde offenbar zerstört, und die nach sechs Stunden Testdauer zuerst erkennbare Wuchsstoffwirkung des Chromatogrammabschnittes 8 ist sehr wahrscheinlich auf den W.S. III zurückzuführen. Der W.S. II ist als solcher nur wenig deutlich, doch zeigt sich ohne Zweifel das Verschwinden einer anfänglich hemmenden Wirkung an der entsprechenden Stelle des Chromatogramms. Über den W.S. IV läßt sich nach diesen Versuchen nur schwer etwas aussagen. Im hier abgebildeten wie in einem anderen, gleichartigen Versuch war die zweite

Chromatogrammzone wuchsstoffleer, während die dritte fördernde Wirkung hatte. Ob es sich dabei um den W.S. IV handelt oder um einen Schwanz des W.S. II, ist nicht zu entscheiden.

Deutlich zum Ausdruck kam auch bei der verminderten Menge Ausgangsmaterial die Hemmstoffwirkung im sechsten Chromatogrammabschnitt. Während sich diese in den oben beschriebenen Versuchen jedoch fortgesetzt verstärkte, war jetzt die maximale Hemmung nach einem Tag eingetreten, und danach trat ein allmählicher Längenausgleich ein. Das besagt also, daß hier während des zweiten und dritten Testtages ein erhöhtes Wachstum stattfand. Beide Versuche zeigten dies in gleicher Weise.

Eine Verminderung des Ausgangsmaterials auf sechs Scutellen in zwei Versuchen ließ die Hemmstoffwirkung fast ganz verschwinden. Nur eine Spur davon war nach einem und zwei Tagen in einem der Versuche zu erkennen, während der andere Versuch statt dessen gar fördernde Wirkung der in Frage kommenden Chromatogrammzone ergab. Im übrigen zeigten sich bei dieser geringen Extraktkonzentration der W.S. II und andeutungsweise der W. S. IV. Einen IES-Gipfel zeigten die Wirkungskurven nicht.

In einem Doppelversuch wurden schließlich zwei Konzentrationen (Extrakte von 5 bzw. 10 Scutellen) zur gleichen Zeit verglichen. Bei diesem Versuch zeigte sich der Hemmstoff mit R_f 0,6 bei der höheren Konzentration.

β) Versuche mit Gelbem Badischem Landmais. Vergleicht man die Wirkungskurven perhydrolbehandelter, alkoholischer Scutellumextrakte von gut 20 Körnern Badischem Landmais mit solchen von Hybrid-Mais, so ist das augenfälligste Merkmal der beiden Sorten gemeinsame Förderungsgipfel in der vierten Chromatogrammzone, also im Bereich des W.S. II. Beide Male ging dieser Wachstumsförderung auch eine leichte anfängliche Hemmung voraus. Die Lage des W.S. II auf den mit Isopropanol-Wasser entwickelten Chromatogrammen stimmte genau überein (obgleich die R_f-Werte der synthetischen IES sich bei den beiden Versuchsgruppen sehr unterschieden). Auch der W.S. IV schien beim Badischen Landmais wenigstens teilweise die H_2O_2-Einwirkung zu überstehen, wenngleich die verbleibende Wuchsstoffwirkung nur recht gering war. Nicht ganz klar wurde es, wieweit an dem stets vorhandenen Maximum bei R_f 0,8 ein etwaiger Rest unzerstörter IES oder der hier zu erwartende W.S. III beteiligt waren. Während ein Versuch an dieser Chromatogrammstelle bei der ersten Testablesung noch keinerlei Wuchsstoffwirkung erkennen ließ, war in zwei anderen Fällen von Anfang an an der Stelle der IES eine kleine Förderungszacke in der Wirkungskurve vorhanden. Für die spätere Wirkung dürfte aber doch der W.S. III verantwortlich sein.

Weniger deutlich als beim Hybrid-Mais kam bei der deutschen Sorte die Hemmstoffwirkung bei R_f 0,6 zum Vorschein. In einem Versuch, der die Wuchsstoffverhältnisse sehr deutlich zum Ausdruck brachte, fehlte die Hemmung vollständig (Abb. 26). In zwei weiteren Versuchen war sie gut ausgeprägt, fiel aber schwerpunktmäßig einmal in den sechsten und einmal in den siebenten Chromatogrammabschnitt. Abb. 27 stellt eine dieser Wirkungskurven dar. Am zeitlichen Verlauf der Hemmung ist ebenfalls festzustellen, daß vom Hybrid-Mais eine stärkere Wirkung ausging. Beim Badischen Landmais war in der hier benutzten hohen Extraktkonzentration nach 24 Stunden das Maximum der Hemmung erreicht. Danach erfolgte das Wachstum in gleichem Maße wie bei den Kontrollen. Die hemmende Wirkung von 25 Landmaisscutellen war also geringer als die von 22, aber größer als die von 10 Hybrid-Maisscutellen.

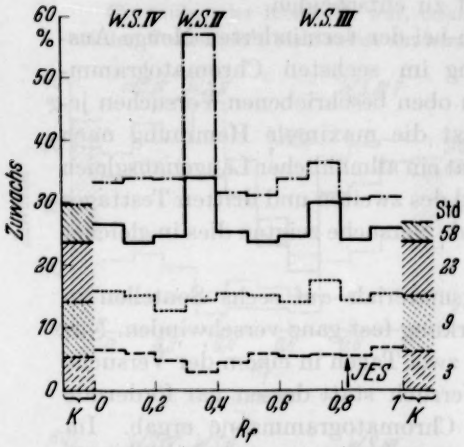


Abb. 26. Ein Versuch mit alkoholischem Extrakt aus 25 Scutellen (Gelber Badischer Landmais), entfettet und mit H_2O_2 behandelt. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.

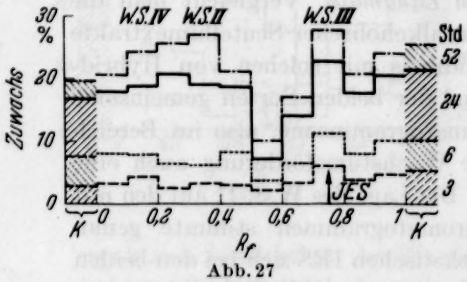


Abb. 27

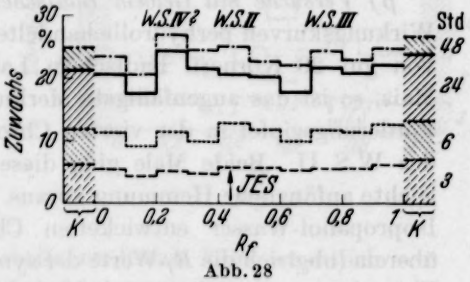


Abb. 28

Abb. 27. Gleichartiger Versuch wie in Abb. 26

Abb. 28. 4 Versuche mit perhydrolbehandeltem entfettetem Alkoholextrakt aus Scutellen von Gelbem Badischem Landmais. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.-Ammoniak

Über die in Abb. 27 erkennbare Hemmung im neunten Chromatogrammabschnitt läßt sich kaum etwas sagen, doch wurde auf eine solche, gelegentlich auch bei der Rohextraktchromatographie vorkommende Erscheinung bereits aufmerksam gemacht.

Wenig Klarheit brachte die ammoniakalische Chromatographie perhydrolbehandelter Scutellumextrakte vom Badischen Landmais (Abb. 28). Erschwerend für die Beurteilung der Versuchsergebnisse war zudem die allgemein geringe Wüchsigkeit der Testzylinder. Schwache, z. T. nur relative Zuwachs-Maxima verursachten

die Chromatogrammzonen 3, 5 und 8. Während bei dem letztgenannten der W.S. III zu vermuten ist, läßt sich nicht sicher sagen, in welcher Weise bei den ersteren W.S. II und W.S. IV beteiligt waren. Auffallend ist die Ähnlichkeit des linken Teils dieser Wirkungskurve mit dem der Abb. 25. Beide Male zeigte sich eine Hemmstoffwirkung des zweiten Chromatogrammabschnittes, die bei den perhydrolbehandelten Extrakten sogar stärker war als diejenige bei R_f 0,6.

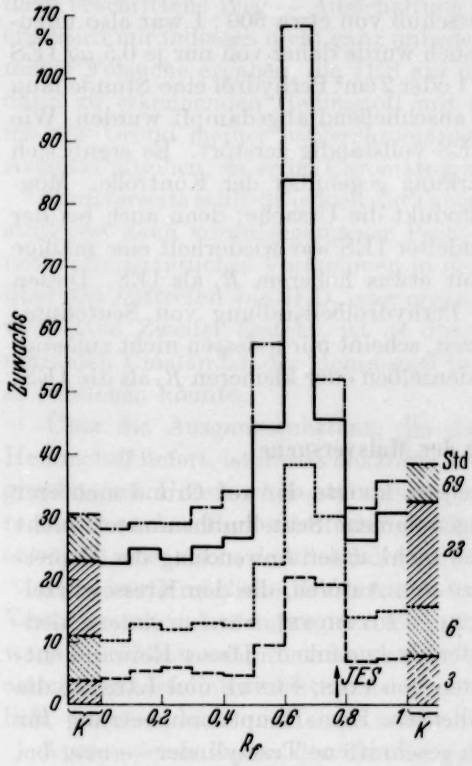


Abb. 29

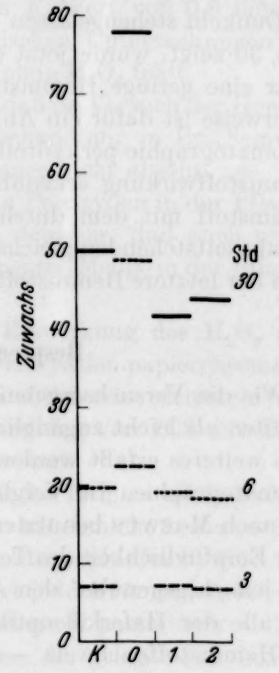


Abb. 30

Abb. 29. Wirkungskurve von perhydrolbehandelter synth. Indolylessigsäure. Chromatographie mit Isopropanol-Aqua bidest.

Abb. 30. Wuchsstoffwirksamkeit von 0,5 µg synth. IES nach Behandlung mit 0; 1 oder 2 cm³ Perhydrol. *K* = wäßriger Agar

Behandlung synthetischer Indolylessigsäure mit H_2O_2

Für diese Versuche wurden das Kaliumsalz und auch die reine, kristalline Säure (beide Präparate lieferte die Firma Bayer, Leverkusen) benutzt. Das leicht wasserlösliche K-Salz wurde zunächst papierchromatographisch vorgereinigt und mit Wasser aufgenommen. Die wasserunlösliche Säure wurde in 20%ige alkoholische Lösung gebracht. 1 mg IES in 1 cm³ Lösungsmittel wurde mit 1 bis 1,8 cm³ Perhydrol versetzt

und gut eine Stunde damit dunkel stehengelassen. Das anschließende Abdampfen auf dem Wasserbad erfolgte in genau der gleichen Weise wie bei den Scutellumversuchen. Der zuletzt etwas gebräunte Rückstand wurde papierchromatographisch zerlegt. Der nachfolgende Test zeigte dann, daß die synthetische IES durch diese Behandlung keineswegs vollständig zerstört war, wie aus Abb. 29 hervorgeht. Säure und Salz verhielten sich dabei gleich. Ein H_2O_2-Überschuß von etwa 500 : 1 war also unzureichend. In einem weiteren Versuch wurde daher von nur je 0,5 μg IES (Säure) ausgegangen[1], die mit 0 ; 1 oder 2 cm³ Perhydrol eine Stunde lang im Dunkeln stehengelassen und anschließend abgedampft wurden. Wie Abb. 30 zeigt, wurde jetzt die IES vollständig zerstört. Es ergab sich sogar eine geringe Hemmstoffwirkung gegenüber der Kontrolle. Möglicherweise ist dafür ein Abbauprodukt die Ursache; denn auch bei der Chromatographie perhydrolbehandelter IES war wiederholt eine mäßige Hemmstoffwirkung erkennbar mit etwas höherem R_f als IES. Diesen Hemmstoff mit dem durch die Perhydrolbehandlung von Scutellumextrakt entstehenden gleichzusetzen, scheint mir indessen nicht zulässig, denn der letztere Hemmstoff hat denselben oder kleineren R_f als die IES.

Besprechung der Maisversuche

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, konnte der auf Grund mehrerer Arbeiten als leicht zugänglich angenommene Scutellumhemmstoff nicht ohne weiteres erfaßt werden, auch nicht unter Anwendung der Papierchromatographie. Im Vergleich zu den Autoren, die den Kressewurzeltest nach MOEWUS benutzten (POHL, TEGETHOFF), wäre an unterschiedliche Empfindlichkeit des Testmaterials zu denken. Dieser Einwand entfällt jedoch gegenüber den Arbeiten von VOSS, FUNKE und LARSEN, die sich alle der Haferkoleoptile bedienten. Eine Hauptvoraussetzung für den Hemmstoffnachweis — frisch geschnittene Testzylinder — mag bei den chromatographischen Untersuchungen nicht in vollem Maße erfüllt gewesen sein, wohl aber war sie es in den vorhergegangenen Versuchen. Und selbst bei den letzteren konnte nur ein einziges Mal eine Wachstumshemmung verzeichnet werden, die später in eine Förderung umschlug, wie das Voss und FUNKE angeben. Eine Hemmstoffwirkung an ganz frischen Zylindern, wie sie Voss beobachtete, indem er Messungen in halbstündigem Abstand vornahm, konnte in meinen Versuchen kaum erfaßt werden; das Wachstum der decapitierten Haferkeimlinge sinkt bekanntlich schnell auf einen recht geringen Betrag ab, woran eine Hemmung nur schwer erkennbar ist.

[1] Diese Menge ergab auf dem Papier noch eine Farbreaktion mit Perchlorsäure-Eisenchlorid-Lösung, während das beim Scutellumextrakt nur einmal der Fall war bei Benutzung einer übernormalen Anzahl von Scutellen.

Aus der Beobachtung, daß wäßrige Scutellumextrakte stärkere Wuchsstoffwirkung entfalten als alkoholische, schließen Voss und Funke auf eine relativ geringere Löslichkeit des Hemmstoffes in Wasser. Um den Hemmstoff rein zu erfassen, müßte man den Wuchsstoff aus dem Gemisch entfernen. Der von Voss und Funke dazu beschrittene Weg — Ausschaltung des Wuchsstoffes durch H_2O_2 — erscheint mir indessen nicht ganz unbedenklich. Zwar läßt sich, wie auch meine Versuche ergaben, die IES auf diese Weise zerstören[1]; aber den dann zu erkennenden Hemmstoff mit einem R_f-Wert von 0,6 möchte ich auf Grund meiner papierchromatographischen Untersuchungen als Artefakt ansehen, da er im Chromatogramm ohne H_2O_2 fehlt.

Andererseits schließt jedoch die Tatsache, daß im Versuch der Hemmstoff erst nach voraufgegangener Perhydrolbehandlung in Erscheinung tritt, sein natürliches Vorkommen in der Pflanze nicht absolut aus. Da über das Auftreten von H_2O_2 oder organischen Peroxyden in der Pflanze wohl kein Zweifel besteht, ist es durchaus denkbar, daß auch unter normalen Umständen der Hemmstoff in geringerer Menge in der Pflanze so entstehen könnte.

Über die Ausgangssubstanz, die durch Einwirkung des H_2O_2 den Hemmstoff liefert, ist nichts bekannt. IES dürfte es den papierchromatographischen Untersuchungen zufolge jedoch nicht sein, denn ein nur recht schwacher Hemmstoff, der durch Behandlung von IES mit H_2O_2 entstand, wies einen deutlich höheren R_f-Wert auf.

Eine letzte mögliche Erklärung dafür, daß der Hemmstoff in meinen Versuchen ohne Anwendung von Perhydrol praktisch nicht nachzuweisen war, wäre die Annahme, daß er bei der Chromatographie im R_f-Wert mit einem Wuchsstoff übereinstimmte. Das halte ich jedoch für unwahrscheinlich, da man dann noch einen weiteren Wuchsstoff postulieren müßte.

Von anderen Zonen des Chromatogramms, die gelegentlich hemmstoffverdächtig erschienen, ist einmal der Bereich um R_f 0,9 zu erwähnen, noch eher aber der Abschnitt 2 (R_f 0,1—0,2). Der Gelbe Badische Landmais zeigte im letztgenannten Bereich immer wieder eine gewisse hemmende Wirkung bei ammoniakalischer Chromatographie. Hier jedoch „den Hemmstoff" des Scutellums zu sehen, scheint mir nicht gerechtfertigt; dazu war die Wirkung sicherlich zu gering.

Die Frage, wie es kommt, daß der in der Literatur wiederholt beschriebene Scutellumhemmstoff in meinen Versuchen trotz aller darauf gerichteter Mühe nicht zu erfassen war, muß also zunächst offen bleiben.

[1] Die Zerstörbarkeit der IES steht in direktem Widerspruch zu Befunden von Siegel u. Weintraub (1952), wonach die Inaktivierung der IES an die Gegenwart des Peroxyds gebunden sein soll. Nach Entfernung des letzteren soll die Wuchsstoffwirksamkeit wieder zum Vorschein kommen. — In meinen Versuchen war das offensichtlich nicht der Fall.

Von den Wuchsstoffen des Maisscutellums liegt als aktive Substanz zweifellos IES (= W.S. I) vor. Deren Wirkung war in allen Versuchen von Anfang an deutlich erkennbar. Häufig wurden bei hoher Extraktkonzentration auch Krümmungen an den Testzylindern beobachtet, wie sie oft in gleicher Weise von synthetischer IES verursacht werden. In einem Versuch ließ das mit Perchlorsäure-Eisenchlorid besprühte Chromatogramm sogar die Farbreaktion der natürlichen IES erkennen, ein Zeichen dafür, daß das Hormon in beachtlicher Menge im Scutellum vorhanden ist. Die Anwesenheit von IES in Maiskörnern überhaupt ist bekanntlich schon lange nachgewiesen worden.

W.S. II (R_f 0,4 bei beiden Gemischen) trat am Anfang gar nicht in Erscheinung oder bewirkte eine leichte Hemmung. Wenn in seinem R_f-Bereich bei nicht mit Perhydrol behandeltem Extrakt trotzdem gleich eine Wuchsstoffwirkung erkennbar war, so ist das jedenfalls auf IES zurückzuführen. Bei ammoniakalischer Chromatographie ist dies ohne weiteres verständlich (R_f IES etwa 0,45). Bei Benutzung des schwach sauren Lösungsmittelgemisches Isopropanol-Wasser lief zwar die Hauptmenge der IES beachtlich weiter (R_f etwa 0,70), doch dürfte die IES jetzt in erster Linie als Molekül vorhanden gewesen sein, das schneller wanderte (LINSER 1957). Ein kleinerer Teil war vermutlich noch ionisiert, und das Kation erreichte — wie bei ammoniakalischer Chromatographie — nur einen R_f-Wert von etwa 0,45.

Der im Verlaufe des Testes immer stärker hervortretende W.S. II ist sicher der auch von den früheren Autoren gefundene inaktive Wuchsstoff.

Über die Eigenschaften der beiden anderen Wuchsstoffe (W.S. III R_f 0,8; W.S. IV R_f 0,2) Näheres auszusagen, ist nach den vorliegenden Versuchen kaum möglich. Aus der Beobachtung, daß die zugehörigen Maxima der Wirkungskurven meist erst später hervortraten, läßt sich nicht schließen, ob hier zunächst eine Aktivierung erfolgen mußte, oder ob die verzögerte Wirkung in Schwierigkeiten der Leitung ihre Ursache hatte — eine Frage, auf die POHL (1951) in bezug auf Indolacetaldehyd ausdrücklich hinweist.

Über die chemische Natur dieser Wuchsstoffe lassen sich nur Vermutungen anstellen. Für den W.S. III wäre dem R_f-Wert zufolge vor allem an das Indolactamid zu denken. GOOD u. Mitarbeiter (1956) fanden diesen Stoff in beachtlicher Menge in pflanzlichen Geweben, wenn diese vorher mit synthetischer IES behandelt waren. Über das Verhalten des Indolacetamids im Zylindertest ist mir nichts bekannt, während es im Haferkrümmungstest nach RAADTS u. SÖDING (1957) unwirksam ist. Daß aber in der Pflanze eine Umwandlung des Amids in IES stattfinden kann, erscheint mir durchaus möglich, zumal STOWE u. THIMANN (1954) einen Übergang von IAN zu IES unter Einwirkung von Haferkoleoptilen

feststellten. Sehr wahrscheinlich fällt auch der R_f-Wert des Indolacetaldehyds etwa mit dem des W.S. III zusammen. Nach Angaben verschiedener Autoren (Brown, Henbest u. Jones 1952; Bentley u. Housley 1952) soll der Aldehyd als solcher im Zylindertest unwirksam sein oder schwach hemmen, jedoch leicht Wuchsstoffaktivität erlangen durch Umwandlung zu IES. Für das Indolacetonitril, das in verschiedenen Pflanzen, vor allem in Kohlarten, gefunden wurde (Jones, Henbest, Smith u. Bentley 1952; Fischer 1954, Housley u. Bentley 1956; Britton, Housley u. Bentley 1956) und das im Zylinder- und Krümmungstest stark wirksam ist (Bentley u. Mitarbeiter), gibt Fischer als R_f-Wert in Isopropanol-Wasser-Ammoniak (80 : 15 : 5) 0,85 an. Ähnliche Werte und dementsprechende Wuchsstoffmaxima ihrer Pflanzenextrakte fanden auch die anderen genannten Autoren. In meinen Versuchen wanderte die synthetische Substanz dagegen praktisch mit der Lösungsmittelfront, desgleichen gibt Linskens (1955) als R_f-Wert in Isopropanol-Wasser-Ammoniak (10 : 1 : 1) 0,99 an. Eine Wuchsstoffwirkung des Chromatogrammabschnittes 10 trat bei mir aber nur selten auf. Der W.S. III dürfte somit nicht mit IAN identisch sein, sondern eher mit Indolacetamid, vielleicht auch mit Indolacetaldehyd.

Stowe u. Thimann (1953, 1954) fanden im Maisendosperm außer IES und zwei nicht weiter bekannten Indolwuchsstoffen einen wachstumsfördernden Stoff, den sie als Indolbrenztraubensäure identifiziert zu haben glaubten, mit einem R_f-Wert von 0,12 in Isopropanol-Wasser-Ammoniak (10:1 : 1). Diese Substanz mit meinem W.S. IV des Scutellums gleichzusetzen, scheint mir sehr nahe zu liegen. Ob es sich dabei aber wirklich um die genannte Verbindung handelt, ist fraglich nach Untersuchungen, die Bentley, Farrar, Housley, Smith u. Taylor (1956) durchführten. Diese Autoren geben an, daß synthetische Indolbrenztraubensäure bei der Chromatographie mit Isopropanol-Wasser-Ammoniak (8 : 1 : 1) völlig zerstört wird. Die Wirksamkeit der Säure im Zylindertest führen sie auf Abbauprodukte zurück.

Es ist ferner vielleicht nicht ausgeschlossen, daß der W. S. IV identisch ist mit dem „accelerator a" Kefford's (1955).

Vergleich der Hafer- und der Maisversuche

Als gemeinsames Merkmal aller Untersuchungen an beiden Pflanzenarten ist das Vorkommen von Indolessigsäure zu verzeichnen. Deren Wuchsstoffgipfel in der Wirkungskurve des Chromatogramms stimmte im allgemeinen im R_f-Wert gut überein mit dem Farbfleck der synthetischen Kontrollsubstanz. Weiterhin erscheint es mir durchaus möglich, daß eine Identität besteht zwischen dem W.S. III des Maisscutellums und dem „3. Wuchsstoff" der Haferkoleoptil- und -wurzelspitze. Die

R_f-Werte der dadurch verursachten Förderungszonen bewegten sich um 0,8 bei Chromatographie mit Isopropanol-Wasser-Ammoniak. Allerdings war bei den Haferversuchen mehr eine Verschiebung in die neunte, bei den Maisversuchen in die achte Chromatogrammzone festzustellen. Ob sich darauf jedoch eine Verschiedenheit begründen läßt, erscheint mir sehr fraglich. Bezüglich der übrigen Wuchsstoffe möchte ich annehmen, daß sie bei Hafer und Mais verschiedener Natur sind. Vergleichbar scheint mir indessen noch die Hemmstoffwirkung zu sein, die bei Koleoptilspitzen- und auch Scutellumextrakten häufiger in der 9. bis 10. Chromatogrammzone auftrat. Über die chemische Natur dieses H. S. läßt sich nichts aussagen.

Tabelle. *R_f-Werte der in Hafer und Mais gefundenen Wirkstoffe sowie einiger synthetischer Substanzen*

Lösungsmittel	Äthanol-Wasser-Ammoniak 70:25:5	Isopropanol-Wasser-Ammoniak 80;15:5	Isopropanol-Wasser 80:20	Butanol-Wasser-Ammoniak 10:10:1	Farbreaktion mit $FeCl_3/HClO_4$
IES	0,72	0,50	~0,70[1]	0,30	rot
2. Koleoptil-WS	~0,20**	0,20	0,35	0,15?	
3. Koleoptil-WS		~0,80	0,85	~0,70	
2. Wurzel-WS	~0,35*	0,20		0,15?	
3. Wurzel-WS		~0,80		~0,70	
Mais WS II		0,35—0,40	0,35—0,40		
WS III		~0,80	~0,80		
WS IV		0,15	0,15		
HS nach H_2O_2-Behandlung		0,60	0,60		
Tryptophan		0,34	0,25	0,14	gelb-blaugrau
Indol-Acetamid	0,86	0,85	0,90	0,74	schmutzigviolett
I-Acetonitril	0,95	0,99	0,94	0,92	blau-grünviolett
I-Acrylsäure	0,71	0,49	0,55?	0,17	dunkelgelb
5-OH-IES	0,64	0,24	~0,50 (Schwänze!)	0,06	violett
I-Acetylasparaginsäure**	0,43	0,17		0,01	
Reaktionsprodukte der Amidierung von I-Acetylasparaginsäure					
A?		0,10	0,09	0,01	violett
B?		0,28	0,25	0,11	violett
C?		0,40	0,57	0,23	violett
D?		0,52	0,74	0,39	violett
E?		0,80	0,89	0,78	violett

* Stark schwankende Werte.

** Die Werte sind übernommen von RAADTS u. SÖDING (1957).

Zusammenstellung von R_f-Werten

In der Tabelle sind die R_f-Werte der in Hafer und Mais gefundenen Wirkstoffe zusammengestellt sowie auch diejenigen einiger synthetischer Substanzen, die als chemisch der IES verwandte Stoffe möglicherweise im Wuchsstoffhaushalt der Pflanze eine Rolle spielen könnten[1].

Zusammenfassung

Mit Hilfe der Papierchromatographie wurden untersucht: 1. Wäßrige Rohdiffusate aus Avena-Koleoptilspitzen einerseits und -Wurzelspitzen andererseits; 2. alkoholische Extrakte aus Scutellen gequollener Maiskörner.

Unter Anwendung des Haferzylindertestes und teilweise auch des Haferkrümmungstestes wurden im Koleoptilspitzendiffusat bei Chromatographie mit Isopropanol-Wasser-Ammoniak (80 : 15 : 5) drei Wuchsstoffe gefunden, von denen einer offensichtlich identisch ist mit Indolylessigsäure. Die beiden anderen Wuchsstoffe waren weniger regelmäßig zu erfassen; im Zylindertest traten sie durchweg mit zunehmender Testdauer deutlicher in Erscheinung. Bei Benutzung von Butanol-Wasser-Ammoniak als Chromatographierflüssigkeit waren nur zwei Maxima in der Wirkungskurve des Chromatogramms zu erkennen. Es wird vermutet, daß ein weiterer Wuchsstoff durch IES überlagert wurde.

Im Wurzelspitzendiffusat waren der Chromatographie mit dem Isopropanolgemisch zufolge ebenfalls drei Wuchsstoffe vorhanden. Die Verwendung von Butanol-Wasser-Ammoniak ergab ein den Koleoptilspitzenversuchen entsprechendes Resultat. Es liegt nahe, in beiden Organen die gleichen wirksamen Substanzen zu vermuten.

Bei Benutzung des Isopropanol- und des Butanolgemisches entfaltete das Koleoptil- wie das Wurzelspitzendiffusat in der untersten Chromatogrammzone (R_f 0,0—0,1) eine starke Hemmstoffwirkung. Nach Chromatographie mit Äthanol zeigte sich diese am stärksten im Abschnitt 2 (R_f 0,1—0,2) bzw. 3. Ausschütteln eines Hemmstoffes mit Chloroform war weder aus saurer noch aus alkalischer Lösung möglich. Wahrscheinlich handelte es sich wenigstens zum Teil um eine osmotische Hemmungswirkung auf die Testpflanzen durch Salze.

Das Koleoptilspitzenrohdiffusat bewirkte häufiger auch eine Hemmstoffwirkung im Chromatogrammabschnitt 9 (R_f 0,85). Ein Ausschütteln dieses Koleoptilenhemmstoffes mit Chloroform war auch nicht möglich.

Als beachtenswerte Fehlerquelle bei papierchromatischen Untersuchungen über Wuchs- und Hemmstoffe wurde das Chromatographier-

[1] Für die Herstellung einiger Präparate sei insbesondere den Herren Dr. GRIMMER u. Dr. WALTER vom Chemischen Staatsinstitut Hamburg gedankt.

papier erkannt. Im Papier enthaltene Verunreinigungen, die mit der Lösungsmittelfront wanderten, bewirkten im allgemeinen eine Wachstumshemmung im biologischen Test. Ferner zeigten sich im Haferkrümmungstest mit IES-Vorlage reduzierte Krümmungen bei R_f 0,4 und 0,6. Durch Vorreinigen des Papiers ließ sich die frontnahe Hemmung weitgehend ausschalten, während dies im zweiten Falle nicht möglich war. Die unter solchen Voraussetzungen durchgeführten Versuche werden daher nur mit Vorbehalt gewertet.

Im Maisscutellumextrakt ließen sich bei Chromatographie mit Isopropanol-Wasser (80 : 20) und Isopropanol-Wasser-Ammoniak (80:15:5) vier Wuchsstoffe feststellen. Einer davon ist offensichtlich IES. Ein weiterer (R_f 0,8) ist vielleicht identisch mit einem Wuchsstoff des Haferkeimlings, möglicherweise mit Indolacetamid oder mit Indolacetaldehyd.

Wurde der Scutellumextrakt vor dem Chromatographieren mit 30%igem H_2O_2 behandelt, so wurde die IES zerstört, während die übrigen Wuchsstoffe z.T. erhalten blieben. Ferner trat mit großer Regelmäßigkeit ein Hemmstoff auf mit einem R_f-Wert um 0,6 in Isopropanol-Wasser. Die Wirkung war um so stärker, je höher die Extraktkonzentration war. Geringere Hemmstoffwirkung zeigten in einigen Fällen auch der Chromatogrammabschnitt 2 (R_f 0,1—0,2) sowie der Bereich mit dem R_f-Wert um 0,9. Andeutungsweise traten die letzteren Hemmstoffzonen gelegentlich auch ohne H_2O_2-Behandlung des Extraktes auf.

Nicht papierchromatographisch zerlegter Scutellumextrakt zeigte starke Wuchsstoffwirksamkeit. Nach Behandlung mit Perhydrol wirkten derartige Extrakte im allgemeinen wachstumshemmend.

Es wurde untersucht, wieweit sich synthetische Indolylessigsäure durch H_2O_2 zerstören läßt. Dabei zeigte sich, daß bei Anwendung eines genügend hohen Überschusses an Perhydrol die Wuchsstoffwirkung völlig und irreversibel aufgehoben wird.

Dem Direktor des Staatsinstituts für Allgemeine Botanik Hamburg, Herrn Prof. Dr. W. MEVIUS, danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und alle damit verbundenen Unterstützungen. Das Thema stellte mir Herr Prof. Dr. H. SÖDING. Ihm gilt mein besonderer Dank für sein stets bewiesenenes Interesse an meiner Arbeit und für seine zahlreichen, wertvollen Anregungen und Hinweise. Herzlich danken möchte ich ferner Fräulein Dr. E. RAADTS, die mich in die Arbeitsmethodik einführte und mich darüber hinaus stets mit ihrem Rat unterstützte. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung, die sie mir für einen Teil der Arbeit gewährte.

Literatur

ANDREAE, W. A.: Effect of scopoletin on indoleacetic acid metabolism. Nature (Lond.) **170**, 83 (1952). — AVERS, CH. J., and R. H. GOODWIN: Studies on roots. IV. Effect of coumarin and scopoletin on the standard root growth pattern on phleum pratense. Amer. J. Bot. **43**, 612—620 (1956). — BAUMEISTER, G.: Wuchs-

und Hemmstoffe in der Knolle und im Kraut gesunder und abbaukranker Kartoffelpflanzen. Planta (Berl.) **38**, 683—741 (1950). — BENNET-CLARK, T. A., and N. P. KEFFORD: Chromatography of the growth substances in plant extracts. Nature (Lond.) **171**, 645 (1953). — BENNET-CLARK, T. A., M. S. TAMBIAH and N. P. KEFFORD: Estimation of plant growth substances by partition chromatography. Nature (Lond.) **169**, 452 (1952). — BENTLEY, J. A., and S. HOUSLEY: Studies on plant growth hormones. I. Biological activities of 3-indolylacetaldehyde and 3-indolylacetonitril. J. exp. Bot. **3**, 393 (1952). — BENTLEY, J. A., K. R. FARRAR, S. HOUSLEY, G. F. SMITH and W. C. TAYLOR: Some chemical and physiological properties of 3-indolylpyruvic acid. Biochem. J. **64**, 44—49 (1956). — BRAMESFELD, B.: Untersuchungen zur Frage der β-Indolessigsäurebindung im Maisscutellum. Z. Bot. **49**, 103—124 (1955). — BRITTON, G., S. HOUSLEY and J. A. BENTLEY: Studies in plant growth hormones. V. Chromatography of hormones in excised and intact roots of tomato seedlings. J. exp. Bot. **7**, 239—251 (1956). — BROWN, J. B., H. B. HENBEST and E. R. H. JONES: Synthesis and biological activity of β-indoleacetaldehyde. Nature (Lond.) **169**, 335 (1952). — BROWN, J. B., H. B. HENBEST and E. R. H. JONES: 3-Indolylacetaldehyde and 3-indolylaceton. J. chem. Soc., 3172—3176 (1952). — CRAMER, F.: Papierchromatographie, 3. Aufl. Weinheim 1954. — EBERHARDT, F.: Über fluoreszierende Verbindungen in der Wurzel des Hafers. Ein Beitrag zum Problem der Wurzelausscheidungen. Z. Bot. **43**, 405—422 (1955). — FISCHER, A.: Papierchromatographische und papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten. Planta (Berl.) **43**, 288—314 (1954). — FUNKE, H.: Über Hemm- und Wuchsstoffe des keimenden Maiskorns. Jb. wiss. Bot. **91**, 54—82 (1943). — FUNKE, H., u. H. SÖDING: Über das Wuchsstoff-Hemmstoffsystem der Hafercoleoptile und der Kartoffelknolle. Planta (Berl.) **36**, 341—370 (1948). — GOOD, H. E., W. A. ANDREAE and M. W. H. VAN YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabilosm. II. Some products of the metabolism of exogenous indoleacetic acid in plant tissues. Plant Physiol. **31**, 231—235 (1956). — GOODWIN, R. H.: Evidence for the presence in certain ether extracts of substances partially masking the activity of auxin. Amer. J. Bot. **26**, 130—135 (1939). — GOODWIN, R. H., and F. KAVANAGH: Fluorescing substances in roots. Bull. Torrey Bot. Club **75**, 1—17 (1948). — The isolation of scopoletin, a blue-fluorescing compound from oat roots. Bulletin of the Torrey bot. Club **76**, 255—265 (1949). — GOODWIN, R. H., and B. H. POLLOK: Studies on roots. I. Properties and distribution of fluorescent constituents in avena roots. II. Effects of coumarin, scopoletin, and other substances on growth. Amer. J. Bot. **41**, 516—529 (1954). — GOODWIN, R. H., and C. TAVES: The effect of coumarin derivatives on the growth of avena roots. Amer. J. Bot. **37**, 224—231 (1950). — GORDON, S. A., and R. P. WEBER: Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. **26**, 192—195 (1951). — HOUSLEY, S., and J. A. BENTLEY: Studies in plant growth hormones. IV. Chromatography of hormones and hormone precursors in cabbage. J. exp. Bot. **7**, 219—238 (1956). — HOUSLEY, S., A. BOOTH and I. D. J. PHILLIPS: Stimulation of coleoptile and root growth by extracts of maize. Nature (Lond.) **178**, 255—256 (1956). — HOWELL, R. W.: The inhibiting effect of root tips on the elongation of excised pisum epicotyls, cultured in vitro. Plant Physiol. **29**, 100 (1954). — JONES, E. R. H., H. B. HENBEST, G. F. SMITH and J. A. BENTLEY: Indoleacetonitril a naturally occurring plant growth hormone. Nature (Lond.) **169**, 335 (1952). — KEFFORD, N. P.: The growth substances separated from plant extracts by chromatography. J. exp. Bot. **6**, 129—151, 245—255 (1955). — LARSEN, P.: Über Hemmung des Streckungswachstums durch natürlich vorkommende ätherlösliche Stoffe. Planta (Berl.) **30**, 360—367 (1939). — LEXANDER, K.: Growth regulating substances in the roots of wheat. Physiol. Plant. **6**, 406 (1953). — LINSKENS, H. P.: Papier-

chromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Luckwill, L. C.: Application of paper chromatography to the separation and identification of auxin and growth-inhibitors. Nature (Lond.) **169**, 375 (1952). — Meyer, E.: Über den Wuchsstoff-Hemmstoffgehalt gesunder und abbaukranker Kartoffelknollen. Planta (Berl.) **38**, 213—232 (1950). — Mukherjee, S., and H. C. Srivastava: Improved spray reagent for the detection of sugars. Nature (Lond.) **169**, 330 (1952). — Pohl, R.: Das Hemmstoff-Wuchsstoffsystem des Maisscutellums. Planta (Berl.) **39**, 105—125 (1951). — Die Wirkung von β-Indolacetaldehyd auf das Wachstum der Kressewurzel. Ber. dtsch. bot. Ges. **64**, 132—135 (1951). — Pohl, R., u. B. Tegethoff: Der Hemmstoff des Maisscutellums, ein Wuchsstoffinaktivator. Naturwiss. **36**, 319 (1949). — Raadts, E., u. H. Söding: Chromatographische Untersuchungen über die Wuchsstoffe der Hafercoleoptile. Planta (Berl.) **49**, 47—60 (1957). — Schauer, H. K., u. R. Bulirsch: Über Beziehungen zwischen R_f-Wert und chemischer Konstitution organischer Verbindungen in der Papierchromatographie. Z. Naturforsch. **10**b, 683—693 (1955). — Siegel, S. M., and R.L. Weintraub: Inactivation of 3-indole-acetic-acid by peroxydes. Physiol. Plantarum (Cph.) **5**, 241—247 (1952). — Söding, H.: Die Ausführung des Wentschen Auxintestes am Tageslicht. Ber. dtsch. bot. Ges. **53**, 331 (1935). — Die Wuchsstofflehre. Stuttgart 1952. — Söding, H., u. H. Funke: Über Empfindlichkeitsschwankungen des Hafertestes und ihre Beziehung zu Wetterfaktoren. Jb. wiss. Bot. **90**, 1—24 (1942). — Stowe, B. B., and K. V. Thimann: Indolepyruvic acid in maize. Nature (Lond.) **172**, 764 (1953). — The paper chromatography of indole compounds and some indole-containing auxins of plant tissues. Arch. Biochem. **51**, 499—516 (1954). — Tegethoff, B.: Zur Frage der Wuchsstoffinaktivierung im Maisscutellum. Planta (Berl.) **38**, 648—682 (1951). — Terpstra, W.: Extraction and identification of growth substances. Proc. kon. ned. Akad. wet., Sor. C **56**, 206 (1953). — Vogt, I.: Über den Hemm- und Wuchsstoffgehalt in Getreidewurzeln. Planta (Berl.) **40**, 145—169 (1951). — Voss, H.: Wuchsstoffaktivierung und -inaktivierung und ihre keimungsregulatorische Bedeutung. Planta (Berl.) **27**, 432—435 (1937). — Nachweis des inaktiven Wuchsstoffes, eines Wuchsstoffantagonisten und deren wachstumsregulatorische Bedeutung. Planta (Berl.) **30**, 253—285 (1939).

Dr. H. Bohling,
Jork (Bez. Hamburg), Obstbauversuchsanstalt

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach Jansen" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u.a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Chemie der Genetik

9. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 17./19. April 1958 in Mosbach/Baden. Mit 61 Textabbildungen. VI, 173 Seiten 8°. 1959.

Steif geheftet DM 28.60

Inhaltsübersicht: **Die Feinstruktur des Kerns während der Spermiogenese.** Von H. Ris, Madison, USA. — **Der Zellkern der somatischen Zelle.** Von G. Siebert, Mainz. — **Cytochemische Untersuchungen an basischen Kernproteinen während der Gametenbildung, Befruchtung und Entwicklung.** Von M. Alfert, Berkeley, USA. — **Bakterien-Transformation.** Von A. Wacker, Berlin-Charlottenburg. — **Transduktion.** Von F. Kaudewitz, Tübingen. — **Einige Probleme der Phagengenetik.** Von W. Weidel, Tübingen. — **Genetische Kontrolle der Eiweißsynthese.** Von J. Waldenström, Malmö, Schweden. — Diskussion zu jedem Referat.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Handbuch der Pflanzenphysiologie
Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von **W. Ruhland** in Gemeinschaft mit E. Ashby, J. Bonner, M. Geiger-Huber, W. O. James, A. Lang, D. Müller, M. G. Stålfelt.

In 18 Bänden. Jeder Band ist einzeln käuflich.

Band XVII:

Physiologie der Bewegungen
Physiology of Movements

Teil 1:

Bewegungen durch Einflüsse mechanischer und elektrischer Natur sowie durch Strahlungen

Movements due to Mechanical and Electrical Stimuli and to Radiations

Bearbeitet von L. Baillaud, G. H. Banbury, L. Brauner, E. Bünning, R. K. Clayton, A. W. Galston, H. v. Guttenberg, W. Haupt, O. V. S. Heath, A. R. Schrank, M. G. Stålfelt, K. Umrath. Redigiert von **E. Bünning.** Mit 513 Abbildungen. XVI, 716 Seiten Gr.-8°. 1959. Ganzleinen DM 216.—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes
Subskriptionspreis Ganzleinen DM 172.80

Inhaltsübersicht: **Einführung und Übersicht.** — **Allgemeines.** Allgemeine Gesetze und Phänomene der pflanzlichen Bewegungsphysiologie. Der Erregungsvorgang. Mögliche Mechanismen von Krümmungsbewegungen. — **Die Wirkung von Wundreizen.** — **Die Wirkung elektrischer Reize.** Allgemeines über die Wirkung elektrischer Reize auf Zellen. Electronasty and electrotropism. Galvanotaxis. — **Seismo- und Thigmoreaktionen.** Seismonastie. Thigmonastie und Thigmotropismus. — **Phototaxis.** Chloroplastenbewegung. Die Phototaxis der Algen. Phototaxis of purple bacteria. — **Photodinese.** — **Reizbewegungen der Spaltöffnungen.** Die physiologische Anatomie der Spaltöffnungen. Light and carbon dioxide in stomatal movements. Sonstige Reizreaktionen der Spaltöffnungen. — **Phototropismus und Photonastie.** Phototropismus und Photonastie der Laubblätter. Phototropism of stems, roots and coleoptiles. Phototropism of lower plants. — **Tagesperiodische Bewegungen.** Allgemeiner Überblick. Allgemeine Bedingungen der Bewegungen und Bewegungsmechanik. Regulierende Faktoren der Bewegungen. — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis. — Namenverzeichnis — Author-Index. — Sachverzeichnis (Deutsch-Englisch). — Subject Index (English-German).

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany